

# Optimizacija uvjeta detekcije MEKC-MS/MS metode za istovremeno određivanje šest lijekova u terapiji raka dojke

---

Stjepanović, Petra

Master's thesis / Diplomski rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:883689>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom](#).

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-18**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



Petra Stjepanović

**Optimizacija uvjeta detekcije MEKC-MS/MS  
metode za istovremeno određivanje šest lijekova  
u terapiji raka dojke**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2024.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Analitika lijekova Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za analitiku i kontrolu lijekova pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Mirande Sertić.

*Zahvaljujem mentorici izv.prof.dr.sc. Mirandi Sertić na stručnom vodstvu, savjetima i vremenu koje je izdvojila tijekom izrade moga rada.*

*Hvala mag.pharm.Zvonimiru Mlinariću na svim savjetima i razjašnjenim stvarima koje su me mučile dok sam pisala rad.*

*Mama, hvala na tvojoj podršci i ljubavi koja me prati kroz cijeli život. Bez tebe nikada ne bih bila ovdje gdje sam sada. Volim te i hvala što postojiš!*

*Tata, žao mi je što za tvoga života nismo nikada uspjeli biti bliski. Unatoč svemu, hvala ti na svakom lijepom i manje lijepom trenutku jer su me učinili osobom koja sam danas.*

*Hvala mojoj kolegici iz školskih klupa, Doris, što unatoč kilometrima koji nas dijele od početka fakulteta je uvijek tu za mene kada ju trebam i nadam se da nas čeka još mnogo godina lijepog prijateljstva.*

*Hvala mojim Planinarima što su obilježili moje fakultetsko obrazovanje kroz raznorazne oblike druženja i zajednički provedenih trenutaka. Nadam se da nas čekaju još brojne zajedničke avanture!*

*Mojoj 4906 ekipi hvala što su mi uljepšali svaku smjenu i učinili je podnošljivijom. Nadam se da će prijateljstva koja su nastala opstati i van poslovne sfere.*

*Ekipi iz ljekarne u Aninoj, hvala što su bili najbolja moguća ekipa koju sam mogla poželjeti na SO.*

*Također, hvala svim ostalim prijateljima, rodbini te profesorima kroz cijelo moje školovanje.*

Ovaj rad je financiran od strane Hrvatske zaklade za znanost (brojevi projekata UIP-2019–04–8461 i DOK-2021–02–4995) te Europskog fonda za regionalni razvoj FarmInova (broj projekta KK.01.1.1.02.0021).



# SADRŽAJ

<b>1.UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1.KAPILARNA ELEKTROFOREZA.....</b>	<b>1</b>
1.1.1.Elektroosmotski tok.....	1
1.1.2.Micelarna elektrokinetička kromatografija.....	3
<b>1.2.SPEKTROMETRIJA MASA.....</b>	<b>3</b>
1.2.1.Osnovno načelo metode.....	3
1.2.2.Generacija iona.....	4
1.2.3.Analizatori u spektrometriji masa.....	6
1.2.4.Tandemska spektrometrija masa (MS/MS).....	7
<b>1.3.SPREGNUTA TEHNIKA KAPILARNE ELEKTROFOREZE SA SPEKTROMETRIJOM MASA (CE-MS).....</b>	<b>8</b>
1.3.1.CE-MS s protokom pomoćne tekućine.....	9
1.3.2.Upotreba CE-MS metode u praksi.....	10
<b>1.4.RAK DOJKE I ANTITUMORSKI LIJEKOVI U TERAPIJI.....</b>	<b>12</b>
1.4.1.Liječenje hormonski ovisnog raka dojke negativnog na HER2.....	12
<b>2.OBRAZLOŽENJE TEME.....</b>	<b>14</b>
<b>3.MATERIJALI I METODE.....</b>	<b>15</b>
<b>3.1. MATERIJALI.....</b>	<b>15</b>
3.1.1. Radni instrumenti.....	15
3.1.2. Kemikalije.....	15
3.1.3. Pribor.....	15
3.1.4.Programski paketi.....	16
<b>3.2. METODE.....</b>	<b>16</b>
3.2.1. Priprema standardnih otopina.....	16
3.2.2. Priprema radnog pufera.....	16
3.2.3. Priprema instrumenta za analizu.....	17
3.2.4. MEKC uvjeti.....	17
3.2.5. MS/MS uvjeti.....	17
<b>4.REZULTATI I RASPRAVA.....</b>	<b>19</b>
<b>4.1.OPTIMIZACIJA TEMPERATURE I PROTOKA POMOĆNOG PLINA.....</b>	<b>19</b>
4.1.1.Optimizacija temperature pomoćnog plina.....	19

4.1.2.Optimizacija protoka pomoćnog plina.....	20
<b>4.2.OPTIMIZACIJA NAPONA PRIMIJENJENOG NA MLAZNICU.....</b>	<b>21</b>
<b>4.3.OPTIMIZACIJA SASTAVA I PROTOKA POMOĆNE TEKUĆINE.....</b>	<b>22</b>
4.3.1.Odabir organskog otapala.....	22
4.3.2.Optimizacija udjela metanola.....	23
4.3.3.Optimizacija udjela mravlje kiseline.....	24
4.3.4.Brzina protoka pomoćne tekućine.....	25
<b>4.4. OPTIMIZACIJA PLINA UNUTAR ESI IZVORA.....</b>	<b>26</b>
4.4.1.Temperatura plina.....	26
4.4.2.Protok plina.....	27
4.4.3.Tlak plina za raspršivanje.....	28
<b>4.6.OPTIMIZACIJA NAPONA KAPILARE.....</b>	<b>29</b>
<b>5.ZAKLJUČCI.....</b>	<b>31</b>
<b>6.POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA.....</b>	<b>32</b>
<b>7.LITERATURA.....</b>	<b>34</b>
<b>8.SAŽETAK/SUMMARY.....</b>	<b>37</b>
<b>9.TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD.....</b>	<b>39</b>

# 1. UVOD

## 1.1. KAPILARNA ELEKTROFOREZA

Kapilarna elektroforeza (engl. *capillary electrophoresis*, CE) separacijska je tehnika čija se separacija temelji na razlici u brzinama gibanja analita u električnom polju. Brzina gibanja iona dana je izrazom:

$$v = \mu_e E$$

pri čemu je  $v$  brzina gibanja,  $\mu_e$  elektroforetska pokretljivost, a  $E$  primijenjeno električno polje. Jačina električnog polja ovisi o duljini korištene kapilare te o naponu koji je na nju primijenjen. Elektroforetska je pokretljivost dana izrazom:

$$\mu_e = \frac{q}{6\pi\eta r}$$

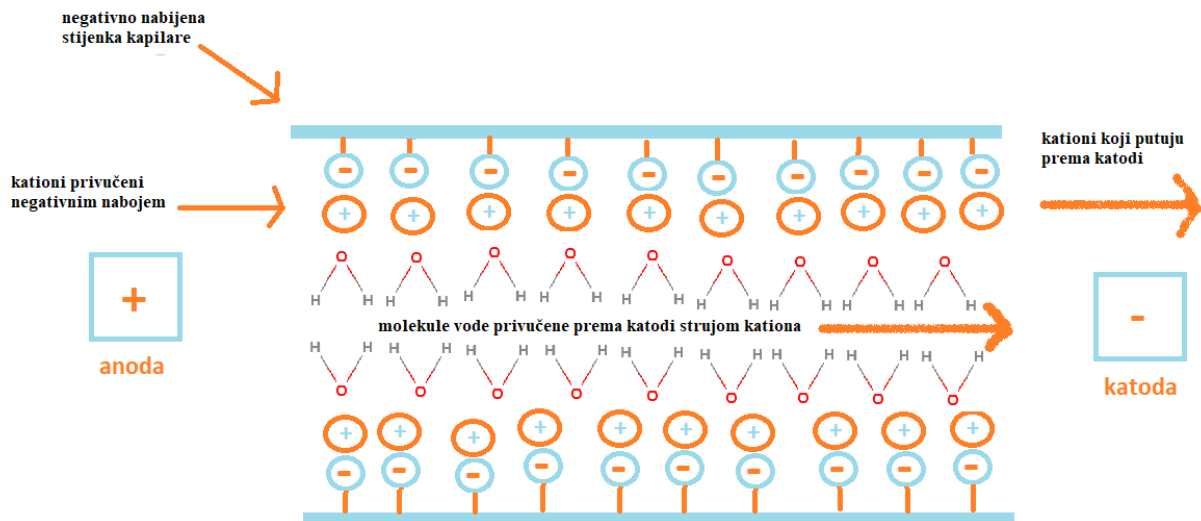
pri čemu je  $q$  naboj iona,  $\eta$  viskoznost medija u kojem se on giba, a  $r$  je polumjer iona (Damić i Nigović, 2010; Watson, 2012).

### 1.1.1. Elektroosmotski tok

Elektroosmotski tok (engl. *electroosmotic flow*, EOF) je osnovno načelo na kojemu se temelji kapilarna elektroforeza. Unutrašnja stijenka kapilare obložena je silanolnim skupinama koje pri pH vrijednostima većima od 3 poprimaju negativan naboj. Njihov negativan naboj u ravnoteži je s pozitivnim nabojem kationa iz pufera kojim je ispunjena kapilara. To rezultira stvaranjem električnog dvosloja na samoj stijenci kapilare, tzv. zeta potencijala. Kada je na kapilaru primijenjeno električno polje, kationi kojih ima u suvišku uz stijenu kapilare, putuju prema suprotno nabijenoj katodi i pritom za sobom vuku molekule vode iz otopine pufera (Slika 1) (Watson, 2012; Kristl i sur., 2014; Lauer i Rozing, 2018).

S obzirom da se udio ioniziranih silanolnih skupina povećava s vrijednostima pH, brzina elektroosmotskog toka uvelike je ovisna o pH. To najbolje objašnjava činjenica da je protok

oko 10 puta veći pri pH 8 nego pri pH 3. Također, EOF ovisi i o koncentraciji pufera, njihove su vrijednosti obrnuto proporcionalne - s porastom koncentracije pufera, EOF će opadati. Razlog tome je veća koncentracija aniona u otopini pufera koji će zbog interakcije s kationima smanjiti pozitivni naboj na unutrašnjoj stijenci kapilare i time reducirati interakciju kationa s molekulama vode (Watson, 2012).



**Slika 1.** Elektroosmotski tok

Jedinstvena karakteristika elektroosmotskog toka, koja ujedno kapilarnoj elektroforezi daje prednost pred tehnikama poput tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (engl. *high performance liquid chromatography*, HPLC), je ravan profil toka. Naime, električna sila koja pokreće EOF gotovo je jednolika kroz cijelu kapilaru, pa tako i na njenim stijenkama. Suprotno tome, kod HPLC-a tok unutar kolone nastaje djelovanjem vanjske pumpe, tj. primjenom tlaka. Zbog trenja koje nastaje na stijenkama, protok je u ovom slučaju laminaran. Ovo je povoljna karakteristika elektroosmotskog toka jer zbog jednoličnosti nema disperzije, odnosno proširivanja zona analita (Damić i Nigović, 2010; Lauer i Rozing, 2018).

Postojanje elektroosmotskog toka znači da će se svi analiti, neovisno o svome naboju, kretati prema katodi. Brzina kationa određena je brzinom elektroosmotskog toka uvećanom za vrijednost ionske mobilnosti kationa, dok je brzina aniona jednaka brzini elektroosmotskog toka umanjenoj za njihovu ionsku mobilnost. Neutralne molekule se gibaju brzinom koja je jednaka brzini EOF. To znači da će do katode najprije doći najmanji kationi koje slijede veći kationi i potom neutralne molekule. Posljednji će do katode doći anioni, koji bi se da nema EOF kretali u suprotnom smjeru od njega, odnosno prema anodi. Stoga će prije do katode stići najveći anioni koji se teže odupiru elektroosmotskom toku, a naposljetku i najmanji anioni (Damić i Nigović, 2010; Watson, 2012).



### **1.1.2. Micelarna elektrokinetička kromatografija**

Micelarna elektrokinetička kromatografija (engl. *micellar electrokinetic chromatography*, MEKC) vrsta je kapilarne elektroforeze te je svojevrsna kombinacija kapilarne elektroforeze i kromatografije. Ima široku primjenu u farmaciji, a njena je glavna prednost da je to jedina elektroforetska tehnika koja, osim nabijenih, može razdvojiti i neutralne molekule (Damić i Nigović, 2010; Lauer i Rozing, 2018).

Kod ove se tehnike, umjesto jednostavnog pufera, koristi visoko koncentrirana otopina surfaktanta u koncentraciji većoj od kritične micelarne koncentracije (CMC). Micele su građene od molekulskih agregata molekula surfaktanta (u prosjeku 60 molekula u slučaju natrijeva-dodecil-sulfata (SDS)). Micele predstavljaju pseudostacionarnu fazu kromatografije u kojoj se molekule analita raspodjeljuju prema koeficijentu razdjeljenja. Sve micele putuju prema katodi, neovisno o svome naboju zbog postojanja elektroosmotskog toka. Brzina gibanja micela jednaka je zbroju elektroosmotskog toka i njihove elektroforetske pokretljivosti, dok voda putuje brzinom koja je jednaka elektroosmotskom toku. Brzina analita će u tom rasponu biti negdje između tih dvaju brzina, ovisno o tome koliko stupa u interakciju sa samom micelom. Hidrofobne molekule će jače stupati u interakcije s micelama i stoga je njihova brzina približna brzini samih micela (Terabe, 2008; Nigović, 2021).

Neutralne molekule u klasičnoj kapilarnoj elektroforezi putuju brzinom elektroosmotskog toka. Dodatkom surfaktanta u otopinu pufera stvara se ravnoteža pri kojoj neutralni analiti putuju ili brzinom koja je jednaka EOF ili brzinom micele. Vrijeme elucije tog analita je funkcija afiniteta analita prema miceli (Giordano i sur., 2019).

## **1.2. SPEKTROMETRIJA MASA**

### **1.2.1. Osnovno načelo metode**

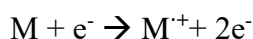
Spektrometrija masa (engl. *mass spectrometry*, MS) je instrumentalna tehnika koja služi za razdvajanje električki nabijenih čestica u plinovitom stanju. Nabijene čestice, tj. ioni proizvedeni su u ionizatoru. U nekim slučajevima, ionizator može sudjelovati u procesu

pretvorbe analita iz čvrstog i tekućeg u plinovito stanje. Ioni u plinovitom stanju nakon toga idu u analizator masa gdje ih on razdvaja u prostoru ili vremenu ovisno o omjeru njihove mase i naboja ( $m/z$ ). Razdvojeni ioni idu do detektora koji proizvodi električne signale koji se procesuiraju i proizvode maseni spektar. Maseni spektar može biti gledan kao histogram iz kojeg dobivamo informacije o ionima različitih  $m/z$  vrijednosti. Detektirani ioni mogu odgovarati originalnim molekulama, njihovim fragmentima ili drugim specijama koje su formirane tijekom ionizacije. Spektrometrija masa omogućuje identifikaciju molekula prema  $m/z$  vrijednostima i prema različitim obrascima fragmentacije iona. To je čini visoko selektivnom kvalitativnom analitičkom tehnikom. Također, ovom je metodom moguća i kvantifikacija iona (Urban, 2016).

### 1.2.2. Generacija iona

Uloga ionizatora je da ionizira, a u nekim slučajevima i prevede uzorak u plinovitu fazu. Neki od najčešćih tipova ionizacije su ionizacija djelovanjem snopa elektrona (engl. *electron impact*, EI), elektrosprej ionizacija (engl. *electrospray ionization*, ESI) i matriksom potpomognuta ionizacija laserskom desorpcijom (engl. *matrix assisted laser desorption ionization*, MALDI) (Finehout i Lee, 2004; Watson, 2012).

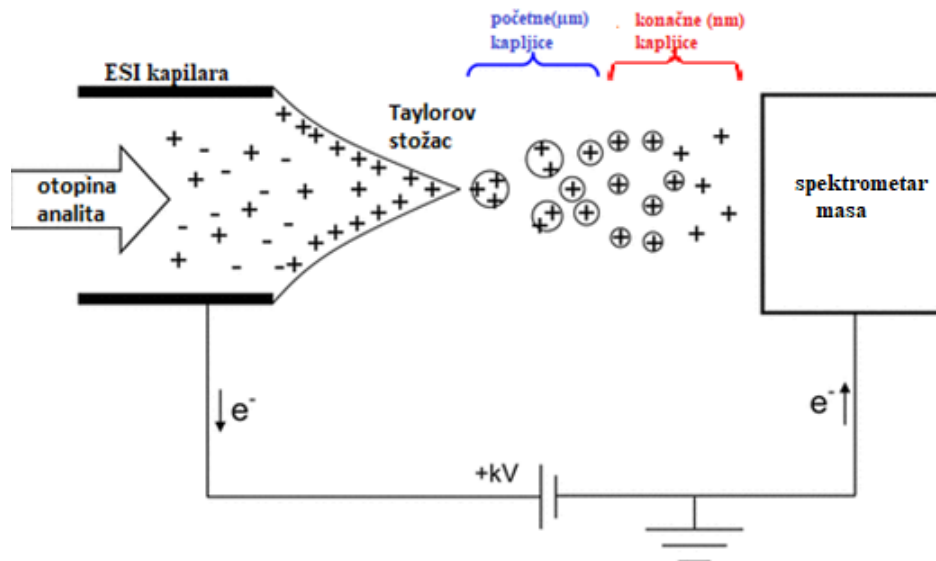
Ionizacija djelovanjem snopa elektrona (EI) danas se još koristi u sprezi plinske kromatografije sa spektrometrijom masa (GC-MS), dok je kod ostalih tehnika većinski napuštena izumom sučelja s elektrosprej ionizacijom (ESI). Prvi korak je zagrijavanje uzorka na kraju sonde dok on ne ispari, potpomognuto visokim vakuumom unutar instrumenta ili kolone plinske kromatografije. Analit preveden u plinovitu fazu zatim se bombardira elektronima koje generira renijska ili volframska nit. Elektroni su ubrzani prema pozitivno nabijenoj meti s energijom od 70 eV, a kako se analit nalazi između niti i mete, doći će do ionizacije:



S obzirom da elektroni imaju mnogo veću energiju od energije veze unutar analita, uglavnom će doći do njegove fragmentacije (Watson, 2012).

Elektrosprej ionizacija (ESI) danas je najčešće upotrebljavana tehnika za analizu uzoraka u tekućem obliku. Budući da ionizira molekule direktno iz tekuće faze, kompatibilna je s klasičnim kromatografskim metodama koje se koriste u analitičkoj kemiji. Odvija se pri

atmosferskom tlaku. Uzorak otopine analita se injektira u metalnu kapilaru pod naponom. Kada se na otopinu primijeni napon, površina tekućine će u mlaznici formirati eliptični oblik. Taj oblik je formiran tako da u svakoj točki njezine površine postoji ravnoteža između dviju dominantnih sila koje djeluju na tekućinu. Površinska napetost nastoji vratiti tekućinu u mlaznicu i time nastoji smanjiti površinu tekućine. Coulombova elektrostatička sila privlači tekućinu prema suprotno nabijenoj elektrodi. Pri određenom naponu, eliptična površina će poprimiti oblik zašiljenog stošca - tzv. Taylorovog stošca i tekućina se raspršuje (Slika 2). Početne kapljice imaju polumjere u mikrometarskom području. Plin raspršivač (suhi N<sub>2</sub>) nalazi se oko kapilare i omogućuje bolje raspršivanje, a istovremeno pomaže usmjeriti raspršene čestice prema spektrometru masa. Raspršenim se česticama smanjuje promjer jer, potpomognuto protokom dušika, isparava otapalo. U konačnici, nastaju ioni u plinovitom stanju koji su privučeni u zagrijanu kapilaru negativnim nabojem koji je na nju primijenjen, što omogućava polagani ulazak iz atmosferskog tlaka u spektrometar masa koji funkcioniра pod visokim vakuumom (Wilm, 2011; Banerjee i Mazumdar, 2012; Watson, 2012; Konermann i sur., 2013).



**Slika 2.** Elektrospreje ionizacija (ESI) (prilagođeno iz: Konermann i sur., 2013)

Matriksom potpomognuta ionizacija laserskom desorpcijom (MALDI) je novija tehnika ionizacije. Temelji se na kokristalizaciji uzorka i organskog matriksa kao što je primjerice

sinapinska ili  $\alpha$ -cijano-4-hidroksicimetna kiselina. Kokristalizacija se postiže miješanjem otopine uzorka i otopine matriksa. Mješavina se potom stavlja na metalnu pločicu i suši. Nastali kristali su potom izloženi laserskim pulsevima na valnoj duljini na kojoj matriks ima visoku spektralnu apsorpciju. Pobuđeni matriks ionizira analit putem transfera protona. Rezultat ovog procesa su ioni u plinovitoj fazi (Finehout i Lee, 2004).

### 1.2.3. Analizatori u spektrometriji masa

Nakon što je uzorak ioniziran, ioni su usmjereni u analizator masa koji ih razdvaja prema njihovim  $m/z$  vrijednostima. Najčešći analizatori masa su magnetski analizator, kvadrupolni analizator, stupica iona (engl. *Ion trap*), analizator vremena leta (engl. *Time of flight*, TOF) te ciklotronska rezonancija s Fourierovom transformacijom (Finehout i Lee, 2004).

Kod magnetskog analizatora ioni se ubrzavaju u električnom polju jačine 3-8 kV i poprimaju uski raspon kinetičkih energija prije ulaska u magnetsko polje. Ioni u magnetskom polju dobivaju otklon, pri čemu veliki ioni imaju manji otklon. Pri određenoj jakosti magnetskog polja i napona kojim se postiže ubrzanje, samo ioni točno određene mase poprimaju putanju koja im omogućuje prolazak kroz izlaznu pukotinu i dolazak do detektora. Time se može zaključiti da se ione različite mase može detektirati variranjem jakosti magnetskog polja ili napona (Watson, 2012; Skoog i sur., 2016).

Kvadrupolni analizatori su jeftiniji i osjetljiviji od magnetskih analizatora. Oni su danas najčešće u upotrebi kod spektrometrije masa. Imaju jako kratko vrijeme skeniranja (<100 ms), što je korisno za detekciju kromatografskih eluenata u stvarnom vremenu. Kvadrupolni analizatori sastoje se od četiri dijagonalno električki povezane elektrode, pri čemu jedan par ima negativan, a drugi pozitivan polaritet. Dodatno, radiofrekventni potencijal izmjenične struje, koji je za  $180^\circ$  izvan faze, primijenjen je na svaki par elektroda. Primjena dva električna polja dovodi do stvaranja rezonantne frekvencije za svaku  $m/z$  vrijednost. Samo ioni koji rezoniraju na frekvenciji kvadrupola mogu proći kroz njega i doći do detektora. To znači da će samo ioni određene  $m/z$  vrijednosti doći do detektora, dok će ostali ioni u nekom trenutku biti privučeni jednom od elektroda i pritom biti neutralizirani (Cindrić i sur., 2009; Watson, 2012; Skoog i sur., 2016).

Stupica iona sastoji se od dviju krajnjih elektroda i centralne prstenaste elektrode koja se nalazi između njih. Ioni se injektiraju u stupicu i ostaju zarobljeni u radiofrekventnom polju koje je primijenjeno na centralnu elektrodu. Stupica je ispunjena helijem koji prigušuje kinetičku energiju iona. Ioni se mogu izbaciti iz stupice primjenom istosmjerne struje na krajnje elektrode. Ukoliko je potrebno fragmentirati samo točno određeni ion, moguće je podesiti da stupica izbaciti sve ione koji nisu od interesa. Ion koji ostaje zarobljen kolidira s atomima helija i pritom stvara svoje fragmente. Ti fragmenti se potom mogu izbaciti iz stupice i detektirati (March, 1991; Watson, 2012).

Kod analizatora vremena leta ioni se ubrzavaju u električnom polju i zatim se puštaju da slobodno lete u cijevi na čijem se kraju nalazi detektor. S obzirom da na tu cijev ne djeluje nikakvo vanjsko polje, kinetička energija iona posljedica je inicijalne akceleracije u električnom polju. Svi ioni koji ulaze u cijev imaju istu kinetičku energiju, a njihova brzina u cijevi varira obrnuto proporcionalno njihovoj masi - manji ioni se gibaju brže i prvi dolaze do detektora, dok su veći ioni sporiji i do detektora dolaze posljednji (Finehout i Lee, 2004; Skoog i sur., 2016).

#### **1.2.4. Tandemska spektrometrija masa (MS/MS)**

Tandemska spektrometrija masa (MS/MS) je metoda koja izolira ion određene  $m/z$  vrijednosti, tzv. prekursor ion, fragmentira ga, te stoga mjeri  $m/z$  vrijednosti ionima koji su dobiveni fragmentacijom. Možemo je podijeliti na tandemsku spektrometriju u prostoru i tandemsku spektrometriju u vremenu (Finehout i Lee, 2004; Skoog i sur., 2016).

Instrumentacija kod tandemske spektrometrije u prostoru sastoji se od dva zasebna analizatora masa. Najčešći oblik je trostruki kvadrupol (engl. *triple quadrupole*, QqQ). Kod njega, ioni koji izlaze iz ionizatora ulaze u kvadrupol 1 (Q) koji djeluje kao klasični kvadrupolni filter masa. Izabrani brzo-gibajući ioni dolaze u kvadrupol 2 (q), koji djeluje kao kolizijska ćelija u kojoj dolazi do disocijacije iona. U ovom kvadrupolu na elektrode nije primijenjen istosmjerni napon. U njemu dolazi do zarobljavanja prekursorskih iona i iona produkata u visokoj koncentraciji kolizijskog plina kako bi se izazvala kolizijom uzrokovana disocijacija (engl. *collision-induced dissociation*, CID). Nakon toga, u kvadrupolu 3 dolazi do analize masa iona produkata koji su nastali u kolizijskoj ćeliji. Kod ove vrste tandemske spektrometrije analiza je moguća do  $MS^2$  (Cindrić i sur., 2009; Skoog i sur., 2016).

Kod tandemске spektrometrije u vremenu ioni se nalaze u određenom prostoru i u nekom trenutku nepoželjni ioni bivaju izbačeni, a preostali ioni se fragmentiraju i analizira se njihova masa u tom istom prostoru. Kod ove se vrste analize može koristiti analizator masa s ionskom stupicom. Ioni se zarobljavaju u ionsku stupicu, a potom se izbacuju svi oni ioni koji nemaju  $m/z$  vrijednost od interesa. Ioni se potom podvrgavaju visokim koncentracijama nekog nereaktivnog plina, primjerice helija, te i kod ove tehnike dolazi do kolizijom uzrokovane disocijacije iona (CID). Nastali fragmenti iona se potom izbacuju i njihova masa biva određena. Također, neki od nastalih fragmenata može se izolirati i podvrgnuti daljnjoj fragmentaciji te stoga analizirati masu njegovih fragmenata. Taj se proces može ponavljati više puta i analiza je moguća do  $MS^n$  (Finehout i Lee, 2004; Skoog i sur., 2016).

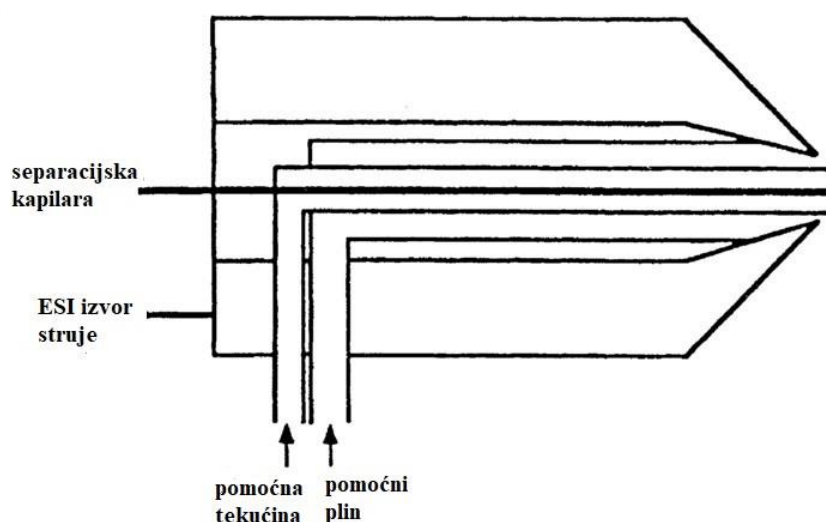
### **1.3. SPREGNUTA TEHNIKA KAPILARNE ELEKTROFOREZE SA SPEKTROMETRIJOM MASA (CE-MS)**

Spregnuta tehnika kapilarne elektroforeze sa spektrometrijom masa tehnika je kojom je moguće analizirati kompleksne polarne spojeve ili nabijene molekule poput metabolita, neurotransmitera, nukleotida, peptida i postranslacijski modificiranih proteina bez prethodne obrade i derivatizacije uzorka. Danas se zbog svoje jednostavnosti najčešće kao sučelje koristi elektrosprej ionizacija (ESI). Sučelje CE-ESI-MS ima dva načina rada - sa i bez protoka pomoćne tekućine (Ramautar, 2016; Fang i sur., 2018).

Sučelje bez protoka pomoćne tekućine koristi separacijsku kapilaru kao raspršivač za elektrosprej, za što je potreban stabilan i izdržljiv električni kontakt na vrhu kapilare te korištenje nekog hlapljivog pufera za separaciju. Ovo se sučelje upotrebljava u CE-MS analizi aminokiselina, proteina i produkata razgradnje proteina. Kod njega ne dolazi do razrjeđivanja uzorka na samome sučelju. No, mikropore kod ovog sučelja se lako začepljuju i zbog toga je njegova upotreba kod kompleksnijih uzoraka limitirana (Fang i sur., 2018).

### 1.3.1. CE-MS s protokom pomoćne tekućine

Spori protok kod kapilarne elektroforeze može dovesti do stvaranja nestabilnog elektrospreja. Stoga se kod ovog sučelja otopini pufera pri izlasku iz separacijske kapilare dodaje pomoćna tekućina, koja doprinosi stabilnosti elektrospreja. Potreba za dodatkom pomoćne tekućine proizlazi iz toga što je kapilarna elektroforeza tehnika kod koje je protok u rangu  $nL\ min^{-1}$ , a sučelje sa spektrometrijom masa zahtijeva protok u rangu  $\mu L\ min^{-1}$ . Najčešće se separacijska elektroforetska kapilara stavlja u metalnu cijev duplih stijenki. Ta cijev omogućuje protok pomoćnog plina (vanjska cijev) i pomoćne tekućine (unutrašnja cijev) koji se sreću s uzorkom na izlasku iz kapilare za separaciju i poboljšavaju uvjete za nastanak elektrospreja (Slika 3) (Klampfl, 2004; Ramautar, 2016; Klampfl i Himmelsbach, 2016).



**Slika 3.** Sučelje CE-MS s protokom pomoćne tekućine (prilagođeno iz: Klampfl, 2004)

Konačna otopina uzorka, odnosno tekućina koja nastane miješanjem pomoćne tekućine s otopinom uzorka iz separacijske kapilare trebala bi imati dovoljnu vodljivost da omogući nesmetani prijenos naboja. Uzimajući to u obzir, optimalna pomoćna tekućina trebala bi sadržavati elektrolite, iako bi taj uvjet već mogao biti zadovoljen doprinosom elektrolita iz otopine pufera iz separacijske kapilare. Unatoč tome, pomoćna tekućina najčešće sadrži dodatne elektrolite koji pojačavaju elektrosprej i stabilnost struje. No, povećanje koncentracije iona u otopini također može dovesti do povećane vjerojatnosti da se ionizacija suprimira, što dovodi do smanjenog intenziteta pikova i povećanog šuma bazne linije. S ove strane,

najpovoljnija je upotreba organskih otapala, idealno malih alifatskih alkohola kao što je metanol. U većini istraživanja, pomoćna tekućina se sastoji od organskog otapala (ili rjeđe smjese organskih otapala) koji su pomiješani s određenim postotkom vode i sadrže neku hlapljivu kiselinu, poput mravlje ili octene kiseline. Od organskih otapala, najčešće su korišteni mali alkoholi poput metanola i iso-propanola. U rjeđim slučajevima se koriste i etanol i acetonitril. Također, važna je i brzina protoka pomoćne tekućine, koja se kreće između 1 i 10  $\mu\text{L min}^{-1}$  (Klampfl i Himmelsbach, 2016; Ramautar, 2016).

Kod elektrosprej ionizacije, nabijene kapljice nastale potpomognute nebulizatorom podliježu desolvataciji djelovanjem plina za sušenje koji struji uz vanjsku površinu kapilare i ulazi u elektrosprej komoru kao protuplin ionima koji ulaze u visoki vakuum. Desolvatacija može biti potpomognuta pomoćnim plinom, najčešće super-zagrijanim dušikom, koji kruži koncentrično oko izvora elektrospreja i koji djeluje tako da koncentrira ione u ograničenu termalnu zonu. U ovome slučaju, plin za sušenje nije toliko bitan za desolvataciju i primarna uloga mu je da djeluje kao protuplin kako bi smanjio šumove koji nastaju kao posljedica ulaska neutralnih molekula u zonu visokog vakuuma (Glauer i Zavitsanos, 2012).

### 1.3.2. Upotreba CE-MS metode u praksi

Spektrometrija masa (MS) iznimno je moćna tehnika za identifikaciju, kvantifikaciju i karakterizaciju raznih molekula. Kapilarna elektroforeza (CE) s druge strane omogućuje brzu separaciju i separaciju visoke rezolucije, a u kombinaciji sa spektrometrijom masa iznimno osjetljivu i selektivnu identifikaciju i detaljnu karakterizaciju molekula. CE-MS se koristi za analizu širokog spektra molekula, uključujući farmaceutike, biofarmaceutike, razne metabolite, peptide i proteine (Seyfinejad i Jouyban, 2022).

U brojnim se istraživanjima danas ispred tehnika spregnutih s plinskom (GC) ili tekućinskom kromatografijom (LC) biraju tehnike spregnute s kapilarnom elektroforezom (CE). Prednosti i nedostaci ove metode navedeni su u Tablici 1 (Seyfinejad i Jouyban, 2022).

Spregnuta tehnika sa spektrometrijom masa smanjuje granicu detekcije uzorka (engl. *limit of detection*, LOD) naspram UV detektora - nema potrebe za kromofornim i fluorofornim skupinama u molekuli, a naknadna rezolucija koeluiranih pikova postiže se koristeći masu kao



drugu dimenziju. Time se povećava osjetljivost metode i značajno eliminira taj najveći nedostatak kapilarne elektroforeze kao analitičke tehnike (Seyfinejad i Jouyban, 2022).

**Tablica 1.** Prednosti i nedostaci kapilarne elektroforeze (Seyfinejad i Jouyban, 2022)

<u>PREDNOSTI</u>	<u>NEDOSTATCI</u>
brza analiza	slaba osjetljivost uz UV-detektor
zahtijeva malu količinu uzorka	
selektivna metoda	
visoka učinkovitost separacije	
manja potrošnja reagensa	
fleksibilnost pri odabiru načina separacije	

S obzirom da CE-MS zadovoljava sve uvjete osjetljivosti, selektivnosti i razlučivosti pikova, farmaceutske kompanije ga koriste za određivanje ljekovitih tvari i njihovih nusprodukata u ljekovitim pripravcima. Također, moguće je određivati aktivne komponente i njihove metabolite u tjelesnim tekućinama. Najčešće upotrebljavano sučelje u ovim ispitivanjima je sučelje s protokom pomoćne tekućine. Zbog intrinzične selektivnosti i specifičnosti MS detekcije, CE-MS sučelje može istovremeno kvantificirati nekoliko ciljnih analita u već gotovim farmaceutskim formulacijama (Schappler i sur., 2016).

Kod analize ljudskih tjelesnih tekućina, glavni je problem osjetljivost metode. Brojni lijekovi imaju veliki volumen distribucije što rezultira njihovom niskom koncentracijom. CE-MS je stoga korisna tehnika za analizu, pogotovo kada su dostupne male količine uzoraka. S obzirom da biološki uzorci (slina, urin, krv, plazma, serum, cerebrospinalna tekućina, uzorci tkiva) mogu sadržavati vodu, soli, proteine, lipide, antikoagulate i brojne druge tvari koje mogu stupati u interakciju s kapilarnom i uvjetima rada (npr. kod injektiranja uzorka i ionizacije), analitičke performanse mogu biti znatno reducirane, pritom smanjujući moć kvantifikacije tvari u ovakvim složenim uzorcima. Također, interferencije iz matrice uzorka mogu smetati spektrometru masa u njegovim performansama. Stoga je važno prije same analize pripremiti uzorak, što može uključivati više koraka poput razrjeđivanja, filtracije, precipitacije proteina i brojnih drugih metoda i postupaka, ovisno o vrsti uzorka i analita (Schappler i sur., 2016).

## 1.4. RAK DOJKE I ANTITUMORSKI LIJEKOVI U TERAPIJI

Rak dojke najčešća je zloćudna bolest kod žena čija se incidencija povećava. No, smrtnost mu se smanjuje zbog sve ranije detekcije i različitih opcija liječenja. Liječenje se temelji na kombinaciji kirurškog liječenja, zračenja i sistemske terapije. Rak dojke se može podijeliti prema različitim podjelama, a jedna od njih je podjela na osnovi proteinskih molekula koje se nalaze na površini tumorskih stanica. Rak dojke definira prisutnost ili odsutnost tri receptora na površini stanica-receptora estrogena (ER), receptora progesterona (PR) i humanog epidermalnog faktora rasta 2 (HER2). Postavlja se negativna ili pozitivna dijagnoza na jedan ili više tih receptora ([www.roche.hr](http://www.roche.hr); Čufer, 2001).

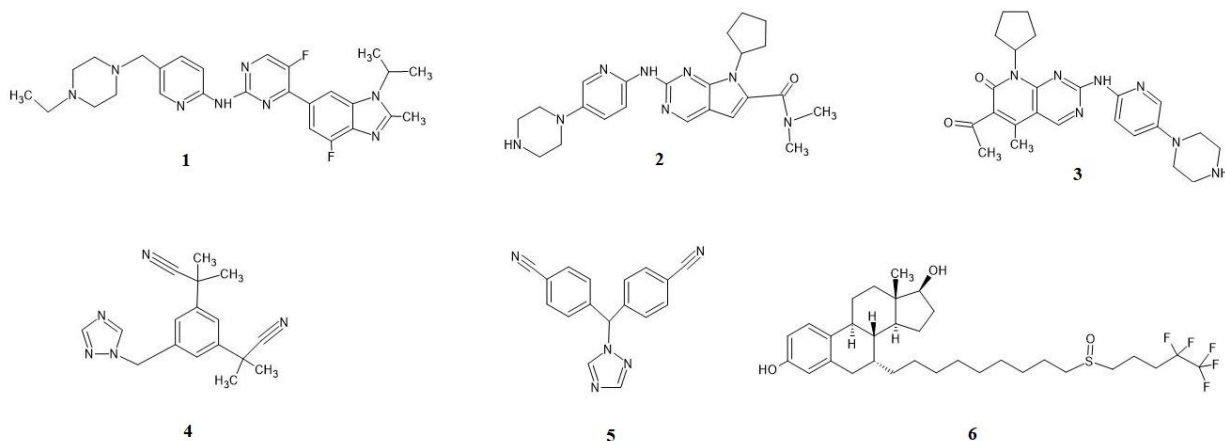
### 1.4.1. Liječenje hormonski ovisnog raka dojke negativnog na HER2

Liječenje hormonski ovisnog raka dojke najbolje je sekvencijski liječiti endokrinom terapijom. Opcije endokrine terapije čine selektivni inhibitori estrogenskih receptora (tamoksifen), aromatazni inhibitori (nesteroidni-letrozol i anastrozol; steroidni-egzemestan), progestini (megestrol-acetat) i selektivni deregulatori estrogenskih receptora (fulvestrant). Ovo je najstarija poznata ciljana terapija u liječenju raka dojke s dobrim toksikološkim profilom. S vremenom je zbog raznih metaboličkih puteva moguće steći rezistenciju na endokrinu terapiju (Ban i sur., 2019).

Što se samog mehanizma djelovanja endokrine terapije tiče, kod hormonski ovisnih tumora važno je ukloniti stimulaciju rasta posredovanu estrogenom. Kod žena u postmenopauzi, većina estrogena nastaje djelovanjem enzima aromataze. Letrozol i anastrozol (Slika 4) kao nesteroidni inhibitori aromataze kompetitivno se vežu za citokrom P450-podjedinicu aromataze i smanjuju sintezu estrogena u svim tkivima u kojima je taj enzim prisutan. S druge strane, fulvestrant (Slika 4) je kompetitivni antagonist ER-a. On se veže na receptore gotovo jednakim afinitetom kao estradiol i time smanjuje vezanje samog estradiola i hormonsku stimulaciju rasta tumora (<https://mediately.co/hr>).

Kontrolne točke staničnog ciklusa se istražuju kako bi se mogle koristiti u liječenju tumora i u svladavanje hormonske rezistencije. Prijelaz staničnog ciklusa iz faze u fazu reguliran je ciklinima i kinazama ovisnima o ciklinima. U patogenezu raka dojke ponajviše su uključeni

ciklin D1 te o ciklinu D ovisne kinaze 4 i 6 (CDK4/6). Izraženost ciklina D1 te aktivnost CDK4/6 pojačana je prenošenjem signala putem estrogenskih receptora (ER). Ciklin D1 je sposoban i bez estrogena aktivirati prijenos signala putem ER-a. CDK4/6 funkcioniraju u kompleksu s D-ciklinima i potiču fosforilaciju retinoblastomskog proteina (Rb) čime ga inhibiraju u njegovoj ulozi da potiče stimulaciju staničnog ciklusa. Hipofosforilirani Rb čvrsto veže transkripcijski faktor E2F, čije otpuštanje inače potiče transkripciju gena za proteine koji potiču prelazak iz G1 u S-fazu ciklusa. Stoga se u terapijske svrhe inhibiraju CDK4/6 čime se stanica „utišava“ i zaustavlja se njezin rast i razmnožavanje. Od inhibitora CDK4/6 danas su u primjeni palbociklib, ribociklib i abemaciclib (Slika 4) (Ban i sur., 2019).



**Slika 4.** Strukture abemacicliba (1), ribocicliba (2), palbocicliba (3), anastrozola (4), letrozola (5) i fulvestranta (6)

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Rak dojke najčešća je zloćudna bolest kod žena čija je incidencija u stalnom porastu. Pravovremeno dijagnosticiranje te individualni pristup terapiji zadnjih su godina, unatoč povećanoj incidenciji, doveli do smanjenja mortaliteta. Prije početka liječenja, važno je ustanoviti o kojem se tipu raka radi ovisno na prisutnost ili odsutnost triju receptora: receptora estrogena (ER), progesterona (PR) te humanog epidermalnog faktora rasta (HER2). Najčešći oblik je hormon pozitivan i HER2 negativan tumor. U terapiji se koriste inhibitori aromataze (anastrozol, letrozol), selektivni deregulatori ER (fulvestrant) te CDK4/6 inhibitori (abemaciclib, palbociclib, ribociclib).

Cilj ovoga rada je razviti MEKC-MS/MS metodu koja će biti korištena za terapijsko praćenje koncentracija lijekova za rak dojke u plazmi. Nakon što su prethodno optimizirani parametri MEKC metode, cilj je optimizirati MS/MS parametre u analizi ovih lijekova. Optimizirani parametri su: temperatura i protok pomoćnog plina, napon mlaznice, sastav i udio organske faze pomoćne tekućine, udio mravlje kiseline u pomoćnoj tekućini, protok pomoćne tekućine, temperatura i protok plina za sušenje te tlak plina za raspršivanje te napon kapilare. Optimizacijom ove metode cilj je osigurati najveću moguću osjetljivost metode te optimalan odaziv detektora kako bi se osiguralo selektivno kvantitativno određivanje lijekova čije su koncentracije u uzorcima vrlo niske.

### **3. MATERIJALI I METODE**

#### **3.1.MATERIJALI**

##### **3.1.1.Radni instrumenti**

- Capillary Electrophoresis 7100 sustav spregnut s 6470 trostruko kvadrupolnim masenim spektrometrom (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD)
- Agilent jet stream ionizacija elektroraspršenjem, AJS-ESI (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD)
- Izokratna pumpa Agilent 1260 infinity II serije opremljena razdjelnikom protoka 1:100 za dopremanje pomoćne tekućine do raspršivača
- Ultrazvučna kupelj Elmasonic S 30 (Elma Schmidbauer, Singen, Njemačka)
- pH-metar FiveEasy (Mettler Toledo, Greifensee, Švicarska)
- Analitička mikrovaga MX5 s mogućnošću očitavanja 1 µg (Mettler Toledo, Greifensee, Švicarska)

##### **3.1.2.Kemikalije**

- Metanol, acetonitril, izopropanol i etanol LC-MS čistoće (Carlo Erba Reagents, Milano, Italija)
- Mravlja kiselina za MS (Carlo Erba Reagents, Milano, Italija)
- Pentadekafluoroktanska kiselina (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, SAD)
- Amonijev hidroksid 25% (Alkaloid, Skopje, Sjeverna Makedonija)
- Ultračista voda provodljivosti 0,055 µS/cm (Merck Milipore Mili-Q IQ 7015, Darmstadt, Njemačka)

##### **3.1.3.Pribor**

- Pipete Rainin (Mettler Toledo, Greifensee, Švicarska)
- Injekcijski filtri 13 mm 0,22 µm (Labex, Johannesburg, Republika Južna Afrika)
- Kapilara od izvučenog kvarca unutarnjeg promjera 50 µm i ukupne duljine 75 cm (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD)

- Bočice za uzorkovanje za kapilarnu elektroforezu (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD)

#### **3.1.4. Programski paketi**

- Masshunter workstation softver verzije 10.1 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD)
- Microsoft Office Excel 2013 (Microsoft, Seattle, WA, SAD)

### **3.2. METODE**

#### **3.2.1. Priprema standardnih otopina**

Standardne otopine abemacikliba, ribocikliba, anastrozola, letrozola i fulvestranta priređene su otapanjem odgovarajuće količine tvari u metanolu do koncentracije 0,5 mg/mL. Standardna otopina palbocikliba se, za razliku od ostalih, dobiva otapanjem odgovarajuće količine tvari u vodi s 0,1% mravlje kiseline također do koncentracije od 0,5 mg/mL. Otopine standarda korištene su svježije. Čuvane su na 4°C i u tim uvjetima bile su stabilne najmanje 8 tjedana.

Radne otopine standarda su priređene neposredno prije analize razrjeđivanjem određenih volumena otopina standarda ispitivanih lijekova s metanolom i vodom do otopine odgovarajućih koncentracija analita sastava metanol-voda (32:68, v/v). Za optimizaciju parametara MS/MS korištena je otopina:

- za optimizaciju temperature pomoćnog plina i napona mlaznice koncentracije abemacikliba, ribocikliba, palbocikliba i anastrozola u otopini bile su 5 µg/mL, a koncentracije letrozola i fulvestranta 10 µg/mL
- za optimizaciju ostalih parametara koncentracije svih ispitivanih lijekova smanjenje su za 50% → 2,5 µg/mL za abemaciklib, ribociklib, palbociklib i anastrozol te 5 µg/mL za letrozol i fulvestrant

#### **4.2.2. Priprema radnog pufera**

Radni pufer pripremljen je otapanjem amonijevog perfluoroktanoata (engl. *Ammonium perfluorooctanoate*, APFO) u metanolu i vodi do koncentracije 125 mM te je titriran 5 M

amonijevim hidroksidom (NH<sub>4</sub>OH) do prividne pH-vrijednosti od 10.5 i otopine sastava metanol-voda (32:68, v/v).

#### **4.2.3. Priprema instrumenta za analizu**

Nove kapilare su, prije prvog korištenja, kondicionirane ispiranjem s 1 M natrijevim hidroksidom (NaOH) kroz 30 minuta, potom 30 minuta ultračistom vodom te još 30 minuta radnim puferom. Kod dnevnog kondicioniranja, kapilara se ispirala s 5 M NH<sub>4</sub>OH kroz 5 minuta, potom 5 minuta ultračistom vodom i 20 minuta radnim puferom. Kapilara je ispirana radnim puferom prije svake analize 5 minuta te je njen vrh prije injektiranja uzorka uronjen u vijalu s ultračistom vodom kako bi se osigurala bolja ponovljivost. Na kraju svakog radnog dana ispirana je 20 minuta ultračistom vodom i do sljedećeg je korištenja bila pohranjena u vodi. Radni puferi su se mijenjali svake 3 analize.

#### **4.2.4. MEKC uvjeti**

Tijekom analize, napon kapilare je bio 25 kV, a temperatura 30°C. Uzorci su hidrodinamički injektirani kroz 30 sekundi i pod tlakom od 50 mbar. Za vrijeme analize je primijenjen dodatni hidrodinamički tlak od 70 mbar.

#### **4.2.5. MS/MS uvjeti**

Spektrometar masa je radio u ESI pozitivnom načinu i načinu rada praćenja višestrukih reakcija (engl. *multiple reaction monitoring*, MRM). Odabrani ionski prijelazi te njihove pripadajuće optimizirane kolizijske energije i fragmentorski naponi prikazani su u Tablici 2. Agilent jet stream (AJS) parametri izvora bili su: napon mlaznice 2000 V, temperatura pomoćnog plina 250°C te njegov protok 5 mL/min. Pomoćna tekućina sastojala se od 70% MeOH u vodi s 0,2% mravlje kiseline, a njen je protok bio 1 mL/min. ESI parametri izvora su bili: temperatura plina 350°C i njegov protok 9 mL/min, tlak plina za raspršivanje 12 psi i napon kapilare 2500 V. Tijekom injektiranja tlak plina raspršivača postavljen je na 1 psi kako bi se spriječila nestabilnost kapilarne struje.

**Tablica 2.** Ionski prijelazi, njihove pripadajuće optimizirane kolizijske energije i fragmentorski naponi

<b>Analit</b>	<b><i>m/z</i> roditeljskog iona</b>	<b><i>m/z</i> iona kvantifikatora</b>	<b><i>m/z</i> iona kvalifikatora</b>	<b>fragmentorski napon (V)</b>
Abemaciclib	507,2	393,0 (21 eV)	176,8 (105 eV)	140
Ribociklib	435,2	322,4 (37 eV)	251,9 (51 eV)	195
Palbociklib	448,2	380,0 (33 eV)	319,5 (49 eV)	185
Anastrozol	294,1	225,1 (25 eV)	210,0 (41 eV)	140
Letrozol	286,0	217,0 (10 eV)	190,0 (37 eV)	90
Fulvestrant	607,4	589,5 (17 eV)	467,2 (25 eV)	145



## **4. REZULTATI I RASPRAVA**

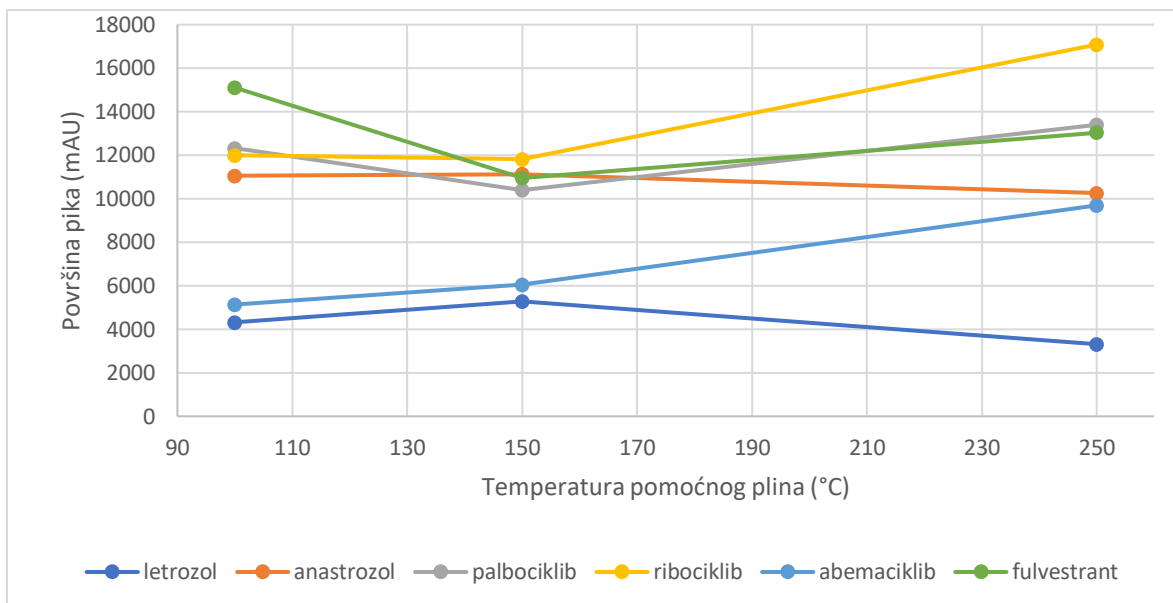
U ovome su radu optimizirani uvjeti rada spektrometrije masa koja služi za detekciju šest lijekova u terapiji raka dojke (abemaciclib, ribociklib, palbociklib, anastrozol, letrozol, fulvestrant) ponajprije podvrgnutih separaciji micelarnom elektrokinetičkom kromatografijom, kao podvrstom kapilarne elektroforeze. Optimizirani su temperatura i protok pomoćnoga plina, napon mlaznice, sastav i udio organske faze pomoćne tekućine, udio mravlje kiseline u pomoćnoj tekućini te njen protok, temperatura i protok plina za sušenje te tlak plina za raspršivanje i napon kapilare.

### **4.1. OPTIMIZACIJA TEMPERATURE I PROTOKA POMOĆNOG PLINA**

Zagrijani pomoćni plin pomaže u tome da se plin za raspršivanje usmjeri tako da bolje i efikasnije prevodi ione u plinovitu fazu i koncentrira ih u ograničenu termalnu zonu, tj. poboljšava formiranje samoga elektrospreja. Time se povećava gustoća iona na samome ulasku u kapilaru spektrometra masa (Mordehai i Fjeldsted, 2009; Tahniyath Sumiya i sur., 2020).

#### **4.1.1. Optimizacija temperature pomoćnog plina**

Ispitan je utjecaj temperature pomoćnoga plina na separaciju šest lijekova za rak dojke u rasponu od 75°C do 250°C. Mjerenja su rađena u triplikatu. Na 75°C dobivena mjerenja bila su nereproducibilna, te su stoga u obzir uzeta samo mjerenja od 100°C do 250°C. Na slici 5 prikazana je ovisnost površine pikova analita o temperaturi pomoćnoga plina. Vidljivo je da je na 250°C površina pikova svih ispitivanih lijekova, osim letrozola i anastrozola, najveća. Stoga je odlučeno da je optimalna temperatura pomoćnoga plina za razdvajanje i detekciju ovih lijekova 250°C.



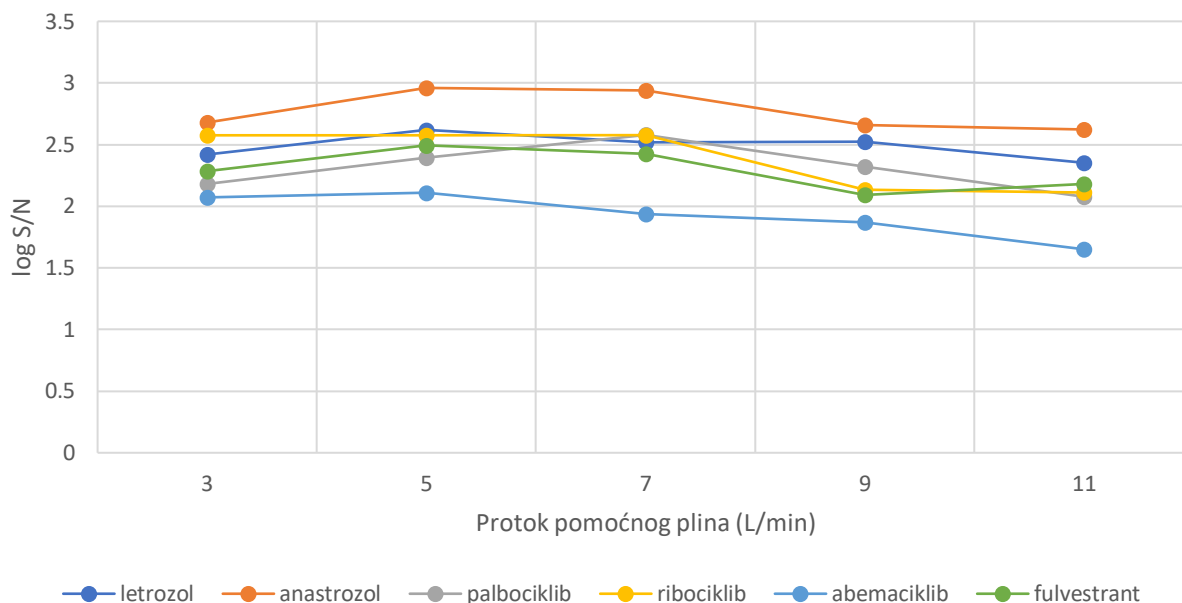
**Slika 5.** Ovisnost površine pikova ispitivanih lijekova o temperaturi pomoćnog plina

*Uvjeti analize:* 125 mM APFO u 32% MeOH, 50 mbar 30 sec injektiranje, 25 kV, 30 °C; SL=50% MeOH, 0,1% FA, 0,4 mL/min; MS=250°C, 5 L/min plin; SG=5 L/min; plin raspršivač =10 psi; napon kapilare=2500 V; napon mlaznice=2000 V

*Uzorak:* smjesa standardnih otopina abemacicliba (5 µg/mL), ribocikliba (5 µg/mL), palbocikliba (5 µg/mL), anastrozola (5 µg/mL), letrozola (10 µg/mL) i fulvestranta (10 µg/mL) u 32% MeOH

#### 4.1.2. Optimizacija protoka pomoćnog plina

Ispitivane su vrijednosti u rasponu od 5 do 11 L/min. Rađena su po tri mjerenja za svaku ispitivanu brzinu protoka. Kao što je vidljivo na slici 6, omjer signala i šuma za sve lijekove raste do brzine protoka od 5 L/min nakon čega vrijednosti kreću opadati za sve osim palbocikliba. Stoga je zaključeno da je optimalna vrijednost protoka pomoćnog plina za separaciju i detekciju ovih lijekova u plazmi 5 L/min.



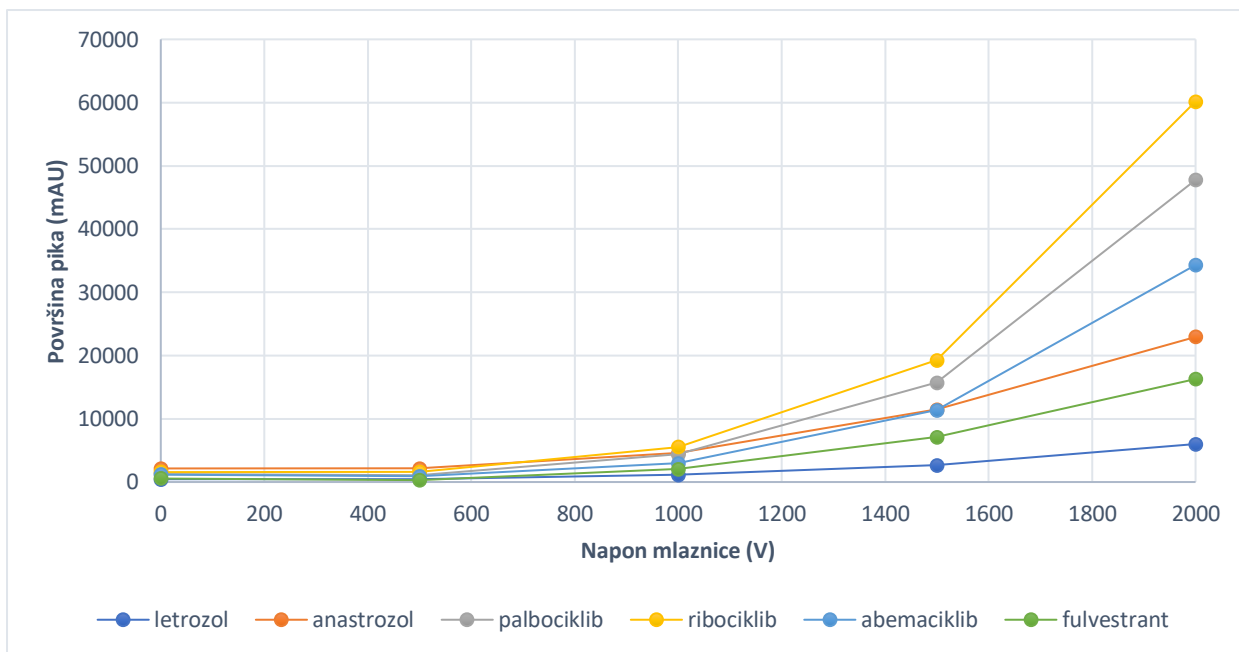
**Slika 6.** Ovisnost omjera signala i šuma o protoku pomoćnog plina

*Uvjeti analize:* 125 mM APFO u 32% MeOH, 50 mbar 30 sec injektiranje, 25 kV, 30 °C; SL=70% MeOH, 0,2% FA, 1 mL/min; MS=250°C, 5 L/min plin; SG=100 °C; plin raspršivač=10 psi; napon kapilare=2500 V; napon mlaznice=2000 V

*Uzorak:* smjesa standardnih otopina abemacikliba (2,5 µg/mL), ribocikliba (2,5 µg/mL), palbocikliba (2,5 µg/mL), anastrozola (2,5 µg/mL), letrozola (5 µg/mL) i fulvestranta (5 µg/mL) u 32% MeOH

#### 4.2. OPTIMIZACIJA NAPONA PRIMIJENJENOG NA MLAZNICU

Prezagrijani pomoćni plin formira zonu termalnog ograničenja i djeluje kao izolator u električnom polju koje generira napon kapilare. Upotreba napona mlaznice omogućava primjenu dodatnog potencijala na vrh kapilare. Time se može prevladati izolirajući učinak i održati električno polje u zoni termalnog ograničenja. Korištenje napona mlaznice ključno je za neutralne spojeve, dok je njen utjecaj na nabijene spojeve zanemariv jer se njihovo formiranje većinom odvija pod utjecajem kapilarnog napona (Moreno-Gonzalez i sur., 2020). Ispitan je utjecaj napona mlaznice na detekciju lijekova od interesa, odnosno odaziv detektora. Mjerenja su rađena u triplicatu. u rasponu od 0 do 2000 V. Uspoređujući dobivene vrijednosti zaključeno je da je osjetljivost najbolja pri naponu od 2000 V. To je vizualno prikazano i na slici 7 koja prikazuje da su površine pikova svih ispitivanih lijekova najveće pri toj vrijednosti.



**Slika 7.** Ovisnost površine pikova ispitivanih lijekova o naponu primijenjenom na mlaznicu  
*Uvjeti analize:* 125 mM APFO u 32% MeOH, 50 mbar 30 sec injektiranje, 25 kV, 30 °C;  
 SL=50% MeOH, 0,1% FA, 0,4 mL/min; MS=250°C, 5 L/min plin; SG=250 °C, 5 L/min; plin  
 raspršivač=10 psi; napon kapilare=2500 V

*Uzorak:* smjesa standardnih otopina abemacikliba (5 µg/mL), ribocikliba (5 µg/mL),  
 palbocikliba (5 µg/mL), anastrozola (5 µg/mL), letrozola (10 µg/mL) i fulvestranta (10 µg/mL)  
 u 32% MeOH

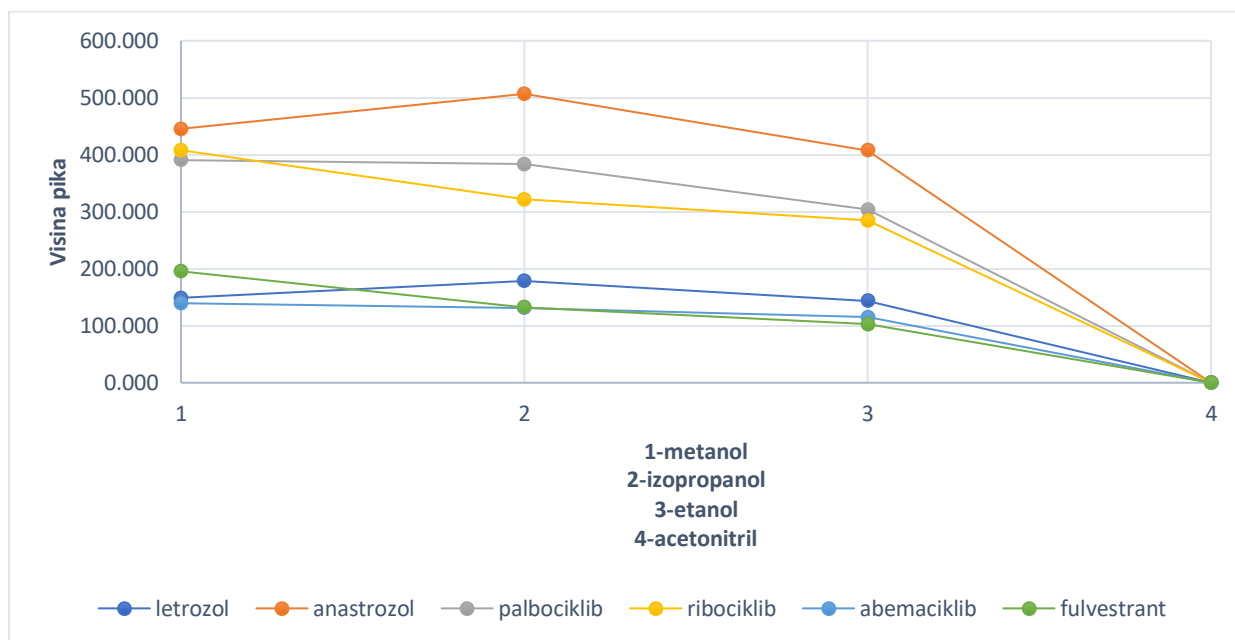
### 4.3. OPTIMIZACIJA SASTAVA I PROTOKA POMOĆNE TEKUĆINE

#### 4.3.1. Odabir organskog otapala

Najčešće korištena organska otapala u sastavu pomoćne tekućine su mali alkoholi, u većini slučajeva metanol ili izopropanol. U rjeđim slučajevima se koriste etanol i acetonitril, a ponekad se koristi i smjesa organskih otapala, poput smjese metanola ili izopropanola s acetonitriplom (Klampfl i Himmelsbach, 2016).

Ispitan je utjecaj vrste organskog otapala na detekciju šest lijekova za rak dojke. Korištena otapala bila su metanol, izopropanol, etanol i acetonitril. Njihov udio u pomoćnoj tekućini bio je 50%, a mjerenja su rađena u triplicatu. Pik letrozola bio je atenuiran kada se koristio acetonitril stoga on više nije razmatran kao potencijalno organsko otapalo. Od preostalih triju organskih otapala, uspoređujući omjer signala i šuma, visine i površine pikova, unatoč

približnim vrijednostima, zaključeno je da se najbolja separacija dobiva korištenjem metanola kao organskog otapala (slika 8).



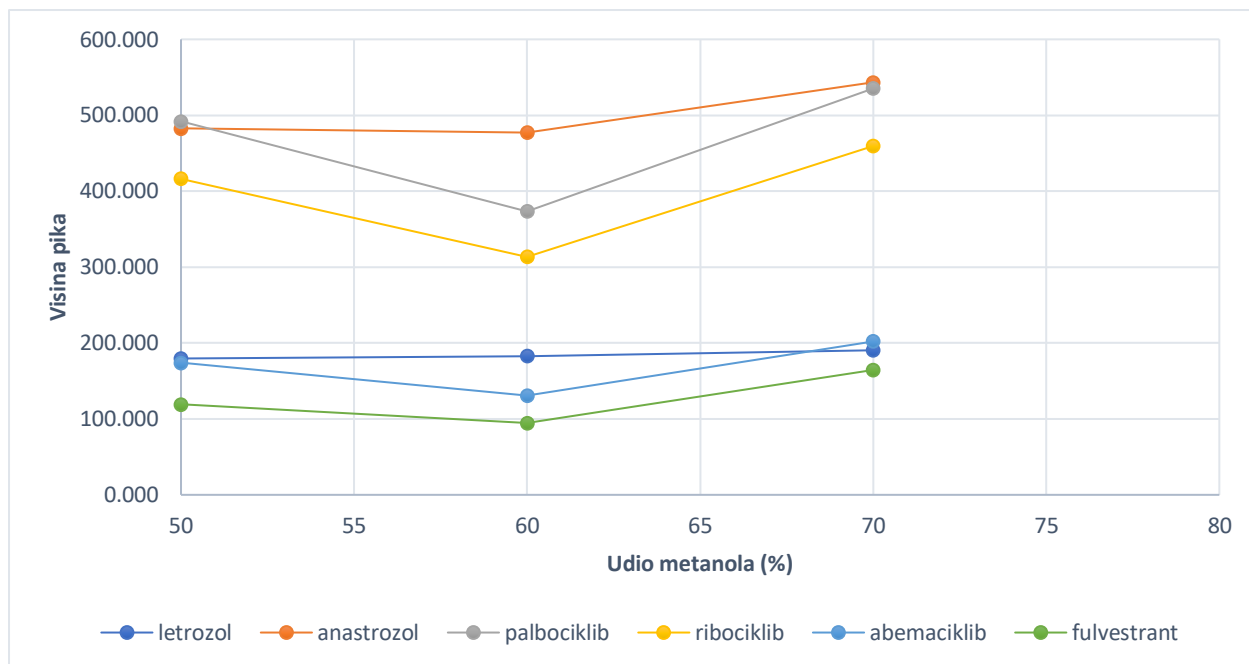
**Slika 8.** Ovisnost visine pikova ispitivanih lijekova o vrsti organskog otapala

*Uvjeti analize:* 125 mM APFO u 32% MeOH, 50 mbar 30 sec injektiranje, 25 kV, 30 °C; SL=50% organska faza, 0,1% FA, 0,4 mL/min; MS=250°C, 5 L/min plin; SG=100 °C, 5 L/min; plin raspršivač=10 psi; napon kapilare=2500 V; napon mlaznice=2000 V

*Uzorak:* smjesa standardnih otopina abemacicliba (2,5 µg/mL), ribocikliba (2,5 µg/mL), palbocikliba (2,5 µg/mL), anastrozola (2,5 µg/mL), letrozola (5 µg/mL) i fulvestranta (5 µg/mL) u 32% MeOH

#### 4.3.2. Optimizacija udjela metanola

Ispitivani su udjeli u rasponu od 50% do 80% metanola u sastavu pomoćne tekućine. Mjerenja su rađena u triplikatu. Udio metanola od 80% pokazuje nešto veću površinu pikova, ali značajno lošiju baznu liniju i omjer signala i šuma te stoga nije daljnje razmatran. Najbolje visine pikova dobivene su kod udjela metanola od 70% te je pritom odlučeno da je to optimalan udio metanola u pomoćnoj tekućini (Slika 9).



**Slika 9.** Ovisnost visine pikova ispitivanih lijekova o udjelu metanola u pomoćnoj tekućini

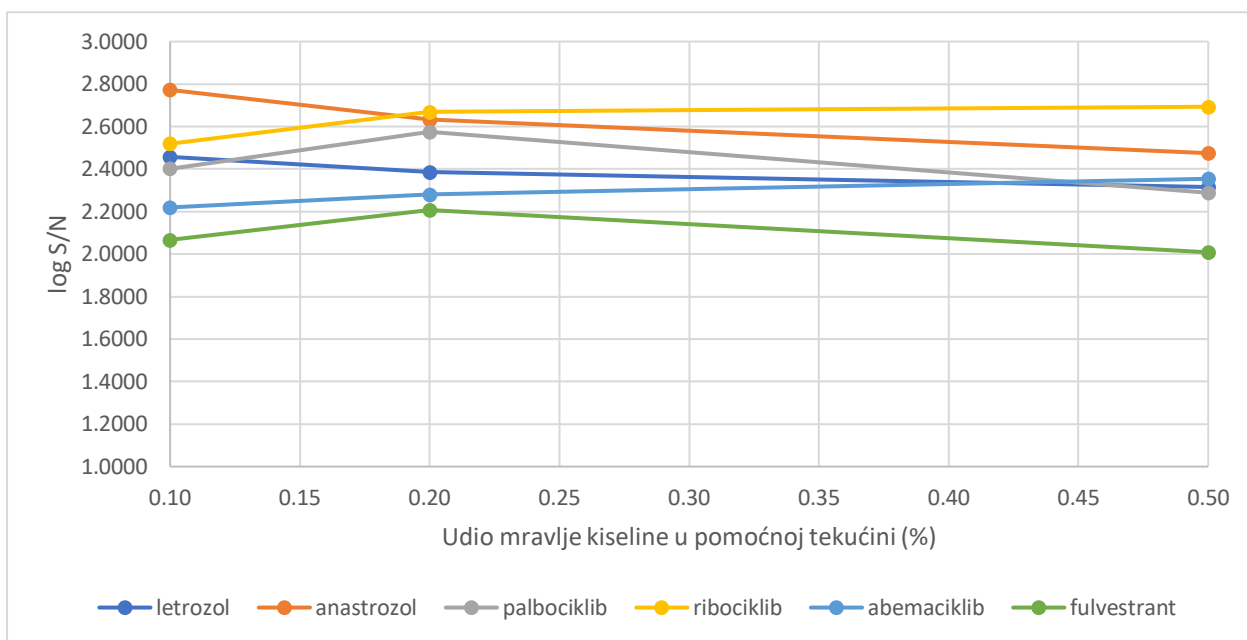
*Uvjeti analize:* 125 mM APFO u 32% MeOH, 50 mbar 30 sec injektiranje, 25 kV, 30 °C; SL=metanol, 0,1% FA, 0,4 mL/min; MS=250°C, 5 L/min plin; SG=100 °C, 5 L/min; plin raspršivač=10 psi; napon kapilare=2500 V; napon mlaznice=2000 V

*Uzorak:* smjesa standardnih otopina abemacicliba (2,5 µg/mL), ribocikliba (2,5 µg/mL), palbocikliba (2,5 µg/mL), anastrozola (2,5 µg/mL), letrozola (5 µg/mL) i fulvestranta (5 µg/mL) u 32% MeOH

#### 4.3.3. Optimizacija udjela mravlje kiseline

Kako bi proces ionizacije prošao neometano, potrebno je osigurati odgovarajući prijenos naboja s obzirom na blizinu sklopa kapilarne elektroforeze te je zbog toga potrebno da pomoćna tekućina ima zadovoljavajuću vodljivost. Kako bi se poboljšala stabilnost elektrospreja i povećala ionizacija otopljenih tvari, u pomoćnu tekućinu dodaju se male koncentracije hlapljivih kiselina (najčešće mravlja ili octena kiselina) ili baza (najčešće alkilni amini ili amonijak) (Klampfl i Himmelsbach, 2016).

Ispitani su udjeli od 0 do 0,5% udjela mravlje kiseline u pomoćnoj tekućini. Mjerenja su rađena u triplicatu. Kao što je vidljivo na slici 10, omjer signala i šuma raste do udjela 0,2% za sve osim anastrozola i letrozola, nakon čega počinje opadati za sve osim abemacicliba i ribocikliba koji najveći omjer signala i šuma imaju pri udjelu od 0,5%. Uzimajući sve u obzir zaključeno je da je optimalni udio mravlje kiseline u sastavu pomoćne tekućine 0,2%.



**Slika 10.** Ovisnost omjera signala i šuma o udjelu mravlje kiseline u pomoćnoj tekućini

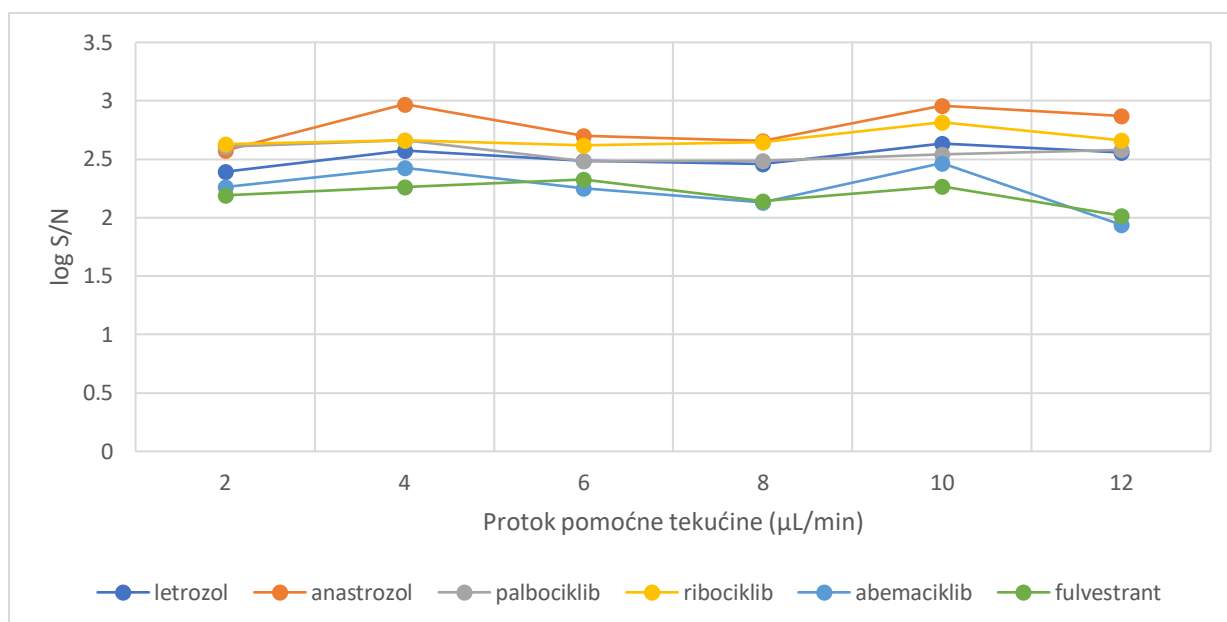
*Uvjeti analize:* 125 mM APFO u 32% MeOH, 50 mbar 30 sec injektiranje, 25 kV, 30 °C; SL=70% metanol, FA, 0,4 mL/min; MS=250°C, 5 L/min plin; SG=100 °C, 5 L/min; plin raspršivač=10 psi; napon kapilare=2500 V; napon mlaznice=2000 V

*Uzorak:* smjesa standardnih otopina abemacicliba (2,5 µg/mL), ribocikliba (2,5 µg/mL), palbocikliba (2,5 µg/mL), anastrozola (2,5 µg/mL), letrozola (5 µg/mL) i fulvestranta (5 µg/mL) u 32% MeOH

#### 4.3.4. Brzina protoka pomoćne tekućine

Brzina protoka pomoćne tekućine najčešće se kreće između 2 i 10 µL/min, za razliku od protoka u kapilarnoj elektroforezi koji se kreće između 20 i 100 nL/min. Kad bi brzina protoka pomoćne tekućine bila viša došlo bi do značajnog razrjeđivanja koncentracije analita koji eluira iz separacijske kapilare što bi rezultiralo značajnim gubitkom osjetljivosti CE-ESI-MS metode (Wu i Tang, 2020).

Ispitivane su brzine protoka u rasponu od 2 do 12 µL/min. Za svaku brzinu rađena su tri uzastopna mjerenja. Uspoređujući dobivene parametre, ustanovljeno je da osjetljivost najbolja pri brzini protoka od 10 µL/min, odnosno 1 mL/min (Slika 11).



**Slika 11.** Ovisnost omjera signala i šuma o brzini protoka pomoćne tekućine

*Uvjeti analize:* 125 mM APFO u 32% MeOH, 50 mbar 30 sec injektiranje, 25 kV, 30 °C;

*SL=70% metanol, 0,2% FA; MS=250°C, 5 L/min plin; SG=100 °C, 5 L/min; plin*

*raspršivač=10 psi; napon kapilare=2500 V; napon mlaznice=2000 V*

*Uzorak:* smjesa standardnih otopina abemacikliba (2,5 μg/mL), ribocikliba (2,5 μg/mL), palbocikliba (2,5 μg/mL), anastrozola (2,5 μg/mL), letrozola (5 μg/mL) i fulvestranta (5 μg/mL) u 32% MeOH

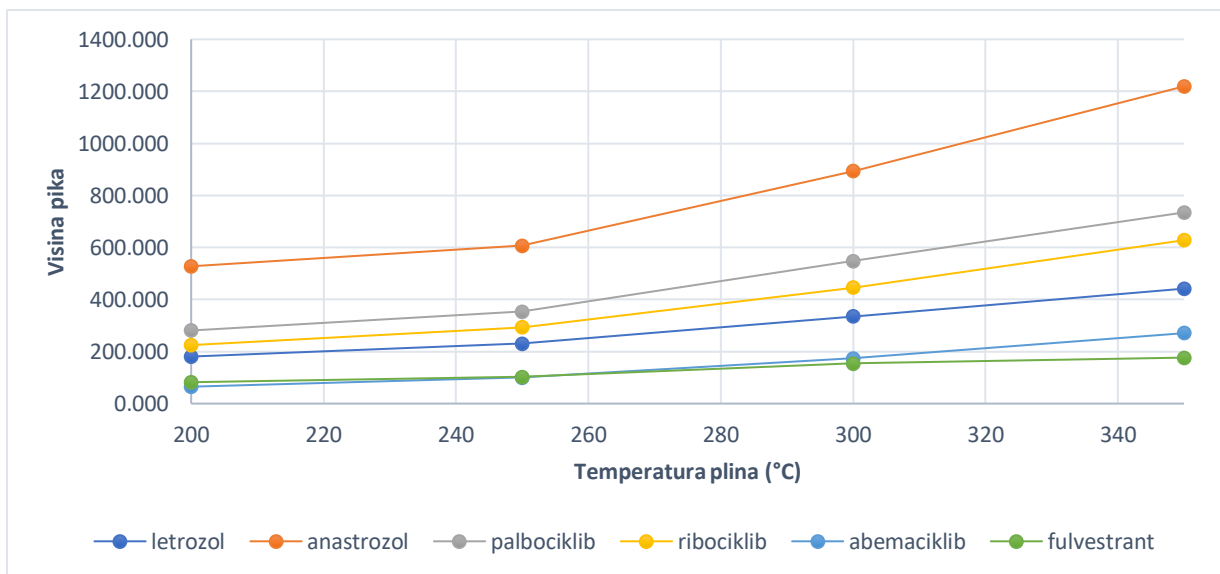
#### 4.4. OPTIMIZACIJA PLINA UNUTAR ESI IZVORA

Plin unutar ESI izvora djeluje kao plin za raspršivanje. To je najčešće suhi N<sub>2</sub>. On okružuje kapilaru i pomaže formiranju elektrospreja, tj. boljem raspršenju tekućeg uzorka. Strujom suhog dušika dolazi do smanjivanja promjera nastalih čestica jer isparava otapalo i formiranja malih plinovitih iona koji se usmjeravaju u maseni spektrometar.

##### 4.4.1. Temperatura plina

Mjerenja za određivanje optimalne temperature plina rađena su u triplicatu i to u rasponu od 200 do 350°C. Uspoređujući omjer signala i šuma, visinu te površinu ispod pikova, došlo je do zaključka da porastom temperature plina raste i visina pikova ispitivanih lijekova te je odlučeno da je optimalna temperatura plina 350°C (Slika 12).





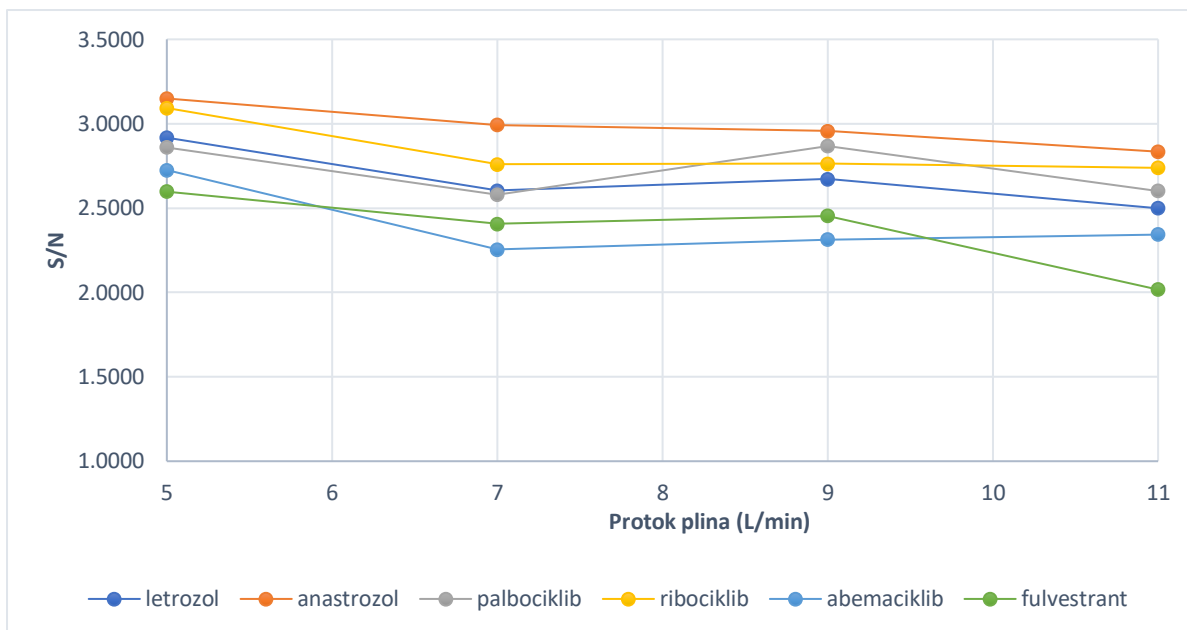
**Slika 12.** Ovisnost visine pikova ispitivanih lijekova o temperaturi plina

*Uvjeti analize: 125 mM APFO u 32% MeOH, 50 mbar 30 sec injektiranje, 25 kV, 30 °C; SL=70% metanol, 0,2 % FA, 1 mL/min; MS= 5 L/min plin; SG=100 °C, 5 L/min; plin raspršivač=10 psi; napon kapilare=2500 V; napon mlaznice=2000 V*

*Uzorak: smjesa standardnih otopina abemacicliba (2,5 µg/mL), ribocikliba (2,5 µg/mL), palbocikliba (2,5 µg/mL), anastrozola (2,5 µg/mL), letrozola (5 µg/mL) i fulvestranta (5 µg/mL) u 32% MeOH*

#### 4.4.2. Protok plina

Ispitivani su protoci plinova u rasponu od 5 do 11 L/min. Rađena su po tri mjerenja za svaku vrijednost protoka. Uspoređujući dobivene vrijednosti (omjer signala i šuma, visina i površina pika) opaženo je da osjetljivost raste do brzine od 9 L/min za većinu ispitivanih lijekova, nakon čega kreće lagano opadati (Slika 13). Stoga je odlučeno da je optimalna brzina protoka plina koji pospešuje nastanak elektrospreja 9 L/min.



**Slika 13.** Ovisnost omjera signala i šuma o brzini protoka plina u ESI izvoru

*Uvjeti analize: 125 mM APFO u 32% MeOH, 50 mbar 30 sec injektiranje, 25 kV, 30 °C;*

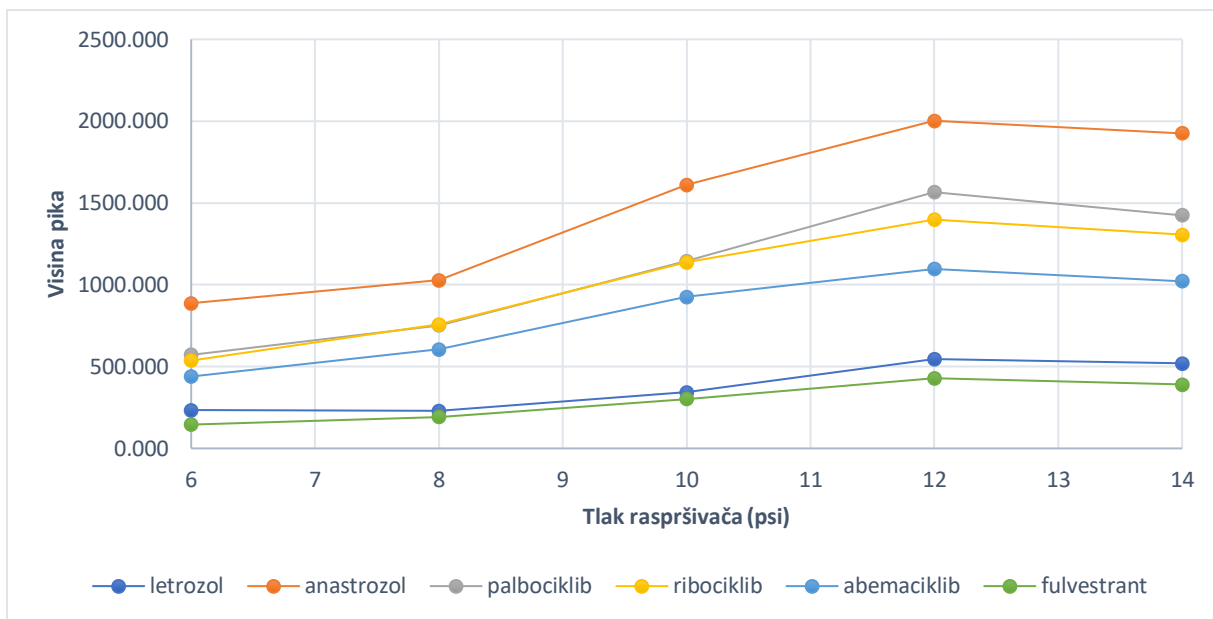
*SL=70% metanol, 0,2 % FA, 1 mL/min; MS=350°C; SG=100 °C, 5 L/min; plin*

*raspršivač=10 psi; napon kapilare=2500 V; napon mlaznice=2000 V*

*Uzorak: smjesa standardnih otopina abemacikliba (2,5 µg/mL), ribocikliba (2,5 µg/mL), palbocikliba (2,5 µg/mL), anastrozola (2,5 µg/mL), letrozola (5 µg/mL) i fulvestranta (5 µg/mL) u 32% MeOH*

#### 4.4.3. Tlak plina za raspršivanje

Mjerenja su rađena u rasponu od 6 do 14 psi. Po tri mjerenja rađena su za vrijednosti tlaka od 6, 8, 10, 12 i 14 psi. Uspoređujući dobivene vrijednosti donesena je odluka da je optimalna vrijednost tlaka za raspršivanje 12 psi, kao što je vidljivo na slici 14 koja prikazuje ovisnost visine dobivenih pikova o tlaku plina za raspršivanje (visina pikova se povećava do tlaka od 12 psi, nakon toga počinje lagano opadati).



**Slika 14.** Ovisnost visine pika o tlaku plina za raspršivanje

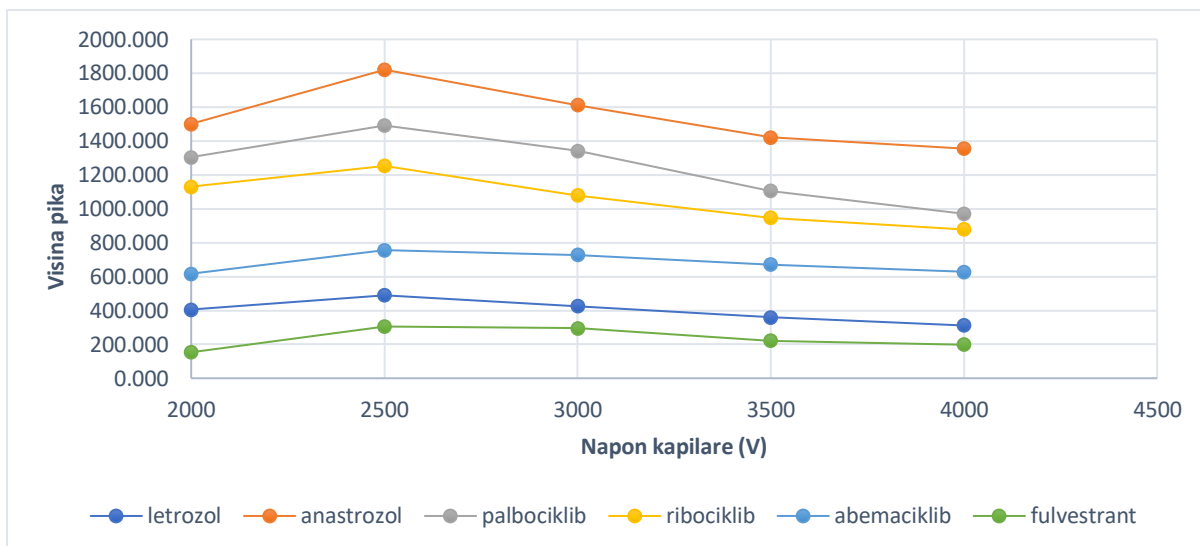
*Uvjeti analize:* 125 mM APFO u 32% MeOH, 50 mbar 30 sec injektiranje, 25 kV, 30 °C; SL=70% metanol, 0,2 % FA, 1 mL/min; MS=350°C, 9 L/min; SG=100 °C, 5 L/min; napon kapilare=2500 V; napon mlaznice=2000 V

*Uzorak:* smjesa standardnih otopina abemacikliba (2,5 µg/mL), ribocikliba (2,5 µg/mL), palbobikliba (2,5 µg/mL), anastrozola (2,5 µg/mL), letrozola (5 µg/mL) i fulvestranta (5 µg/mL) u 32% MeOH

#### 4.6. OPTIMIZACIJA NAPONA KAPILARE

Napon primijenjen na kapilaru potiče nastanak nabijenih iona. Međutim, na učinkovitost nastanka tih iona znatno može utjecati prezagrijani pomoćni plin koji stvara zonu termalnog ograničenja koja djeluje kao izolator za električno polje koje generira napon kapilare. Stoga je, pogotovo u metodi s neutralnim analitima, potrebno koristiti dodatni napon-napon mlaznice (Moreno-Gonzalez i sur., 2020).

Ispitivane su vrijednosti napona od 2000 do 4000 V. Mjerenja su rađena u triplikatu. Parametri koji su se gledali bili su omjer signala i šuma, visina te površina pikova ispitivanih lijekova za rak dojke. Uspoređujući parametre, rast svih triju parametara vidljiv je do napona od 2500 V, nakon čega je uslijedio njihov pad. Stoga je zaključeno da je optimalni napon kapilare za postizanje najbolje razlučivosti 2500 V (Slika 15).



**Slika 15.** Ovisnost visine pika ispitivanih lijekova o naponu primijenjenom na kapilaru

*Uvjeti analize: 125 mM APFO u 32% MeOH, 50 mbar 30 sec injektiranje, 25 kV, 30 °C; SL=70% metanol, 0,2 % FA, 1 mL/min; MS=350°C, 9 L/min; SG=100 °C, 5 L/min; plin raspršivač=12 psi; napon mlaznice=2000 V*

*Uzorak: smjesa standardnih otopina abemacikliba (2,5 µg/mL), ribocikliba (2,5 µg/mL), palbocikliba (2,5 µg/mL), anastrozola (2,5 µg/mL), letrozola (5 µg/mL) i fulvestranta (5 µg/mL) u 32% MeOH*

## 5. ZAKLJUČCI

Cilj ovoga rada bio je osigurati osjetljivost metode kako bi se postiglo određivanje što nižih koncentracija lijekova za rak dojke (abemaciclib, ribociclib, palbociclib, anastrozol, letrozol, fulvestrant). Korištena je metoda spregnute tehnike kapilarne elektroforeze sa spektrometrijom masa. Bitno je osigurati dobru osjetljivost kako bi pikove bilo moguće kvantificirati pri vrlo niskim koncentracijama lijekova u biološkim uzorcima.

U ovome su radu optimizirani uvjeti MS/MS detekcije: temperatura (75-250 °C) i protok pomoćnog plina (3-11 L/min), protok (2-12  $\mu$ L/min) i sastav pomoćne tekućine - odabir prikladnog organskog otapala (metanol, izopropanol, etanol, acetonitril) te njegov udio (50-80%,v/v) i udio mravlje kiseline (0-0,5%, v/v), napon mlaznice (0-2000 V), napon kapilare (2000-4000 V), temperatura (200-350 °C) i protok plina unutar ESI izvora (5-11 L/min) te tlak plina za raspršivanje (6-14 psi. Kao najpovoljniji uvjeti izabrani su: optimalna temperatura pomoćnog plina je 250°C, a njegov protok 5 L/min. Kao najbolje organsko otapalo u sastavu pomoćne tekućine pokazao se metanol i to u udjelu od 70%. Optimalni udio mravlje kiseline u pomoćnoj tekućini je 0,2%, a protok pomoćne tekućine 1 mL/min. Optimalni napon mlaznice je 2000 V, a napon kapilare 2500 V. Parametri plina u ESI izvoru su: temperatura 350 °C, protok 9 L/min i tlak plina za raspršivanje 12 psi.

## 6. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA

$\mu_e$  – elektroforetska pokretljivost

**APFO** (engl. *ammonium perfluorooctanoate*) - amonijev perfluorooktanoat

**CDK4/6** (engl. *Cyclin-dependent kinase 4 and 6*) – o ciklinu D ovisne kinaze 4 i 6

**CE** (engl. *capillary electrophoresis*) – kapilarna elektroforeza

**CID** (engl. *collision-induced dissociation*) – kolizijom uzrokovana disocijacija

**CMC** (engl. *critical micelle concentration*) – kritična micelarna koncentracija

**E** – električno polje primijenjeno na kapilaru

**EI** (engl. *electron impact*) – ionizacija djelovanjem snopa elektrona

**EOF** (engl. *electroosmotic flow*) – elektroosmotski tok

**ER** (engl. *estrogen receptor*) - receptor estrogena

**ESI** (engl. *electrospray ionization*) – elektroprej ionizacija

**FA** (engl. *formic acid*) - mravlja kiselina

**GC** (engl. *gas chromatography*) – plinska kromatografija

**HER2** (engl. *human epidermal growth factor receptor 2*) - receptor za humani epidermalni faktor rasta 2

**HPLC** (engl. *high performance liquid chromatography*) – tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

**LC** (engl. *liquid chromatography*) - tekućinska kromatografija

**LOD** (engl. *limit of detection*) - granica detekcije

$m/z$  – omjer mase i naboja iona

**MALDI** (engl. *matrix assisted laser desorption ionization*) – matriksom potpomognuta ionizacija laserskom desorpcijom

**MEKC** (engl. *micellar electrokinetic chromatography*) – micelarna elektrokinetička kromatografija

**MRM** (engl. *multiple reaction monitoring*) – način rada praćenja višestrukih reakcija kod MS

**MS** (engl. *mass spectrometry*) – spektrometrija masa

**MS/MS** (engl. *tandem mass spectrometry*) – tandemska spektrometrija masa

**PR** (engl. *progesterone receptor*) - receptor progesterona

**q** – naboj iona

**QqQ** (engl. *triple quadrupole*) – trostruki kvadrupol

**r** – polumjer iona

**SDS** (engl. *sodium dodecyl sulphate*) – natrijev docecil-sulfat

**SG** (engl. *sheath gas*) - pomoćni plin

**SL** (engl. *sheath liquid*) - pomoćna tekućina

**TOF** (engl. *time of flight*) – analizator vremena leta

**v** – brzina gibanja u električnom polju

**$\eta$**  – viskoznost medija

## 7. LITERATURA

Ban M, Strikić A, Petrić Miše B, Vrdoljak E. Uloga inhibitora CDK4/6 u liječenju hormonski ovisnoga metastatskog raka dojke negativnog na HER-2. *Liječ vjesn*, 2019, 141, 33-39

Banerjee S, Mazumdar S. Electrospray ionization mass spectrometry: a technique to access the information beyond the molecular weight of the analyte. *Int J Anal Chem*. 2012, 2012:282574

Cindrić M, Marković A, Horvatić A. Spregnute tehnike tekućinski kromatograf – spektrometar masa: osnove metodologije i primjene. *Medicina Fluminensis*, 2009, 45(3), 218-232

Čufer T. Rak dojke. *Medicus*, 2001, 10(2) ,173-178

Damić M, Nigović B. Kapilarna elektroforeza u farmaciji. *Farm. Glas.*, 2010, 66, 195 – 207

Fang P, Pan JZ, Fang Q. A robust and extendable sheath flow interface with minimal dead volume for coupling CE with ESI-MS. *Talanta*, 2018, 180, 376-382

Finehout EJ, Lee KH. An Introduction to Mass Spectrometry Applications in Biological Research. *Biochem. Mol. Biol. Educ.*, 2004, 32(2), 93-100

Giordano BC, Siefert R, Collins GE. Micellar Electrokinetic Chromatography. U: Dutta, D. Microfluidic Electrophoresis: Methods and Protocols. Dutta D, urednik, New York, 2019, str.87-97

Glauer T, Zavitsanos AP. Electrospray Operational Parameters in TOF-MS. U: Comprehensive Analytical Chemistry, Volume 58. Fernandez-Alba AR, urednik, Agilent Technologies, Waldbronn, 2012, str.273-305

Klampfl CW, Himmelsbach M. Sheath Liquids in CE-MS: Role, Parameters, and Optimization. U: Capillary Electrophoresis–Mass Spectrometry (CE-MS): Principles and Applications. De Jong G, urednik, Weinheim, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.KGaA, 2016, 41-61

Klampfl CW. Review coupling of capillary electrochromatography to mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 2004, 1044, 131–144



Konermann L, Ahadi E, Rodriguez AD, Vahidi S. Unraveling the Mechanism of Electrospray Ionization. *Anal. Chem.* 2013, 85, 1, 2–9

Kristl T, Stutz H, Wenz C, Rozing G. Principles and applications of capillary isoelectric focusing. Agilent Technologies, 2014, str.2

Lauer HH, Rozing GP. High performance capillary electrophoresis. Agilent Technologies, 2018, str.7-13, 37-38

March RE. Ion trap mass spectrometry. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes*, 1992, 118/119, 71-135

Mediately baza lijekova, 2023, <https://mediately.co/hr>, pristupljeno 1.9.2023.

Moreno-Gonzalez D, Jač P, Švec F, Novakova L. Determination of Sudan dyes in chili products by micellar electrokinetic chromatography-MS/MS using a volatile surfactant. *Food Chem.*, 2020, 25, 310:125963

Nigović B. Kapilarna elektroforeza. U:Predavanja iz kolegija Analitika lijekova, Zagreb, 2021.

O raku dojke, 2017., [www.roche.hr](http://www.roche.hr), pristupljeno 27.8.2023.

Ramautar R. Capillary Electrophoresis–Mass Spectrometry for Clinical Metabolomics. U: *Advances in Clinical Chemistry*. Makowski S, urednik, Volume 74, Leiden, Elsevier, 2016, str.1-27

Schappler J, Gonzalez-Ruiz V, Rudaz S. CE-MS in Drug Analysis and Bioanalysis. U: *Capillary Electrophoresis-Mass Spectrometry (CE-MS): Principles and Applications*. De Jong G, urednik, Weinheim, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.KGaA, 2016, 129-157

Seyfinejad B, Jouyban A. Capillary electrophoresis-mass spectrometry in pharmaceutical and biomedical analyses. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, Volume 221, 2022, 115059, ISSN 0731-7085

Skoog DA, Holler FJ, Crouch SR. Principles of Instrumental Analysis, Boston, Cengage Learning, 2016, str.259, 517-520, 524-526

Terabe S. Micellar electrokinetic chromatography for high-performance analytical separation. *The Chemical Record*, 2008, 291–301.

Urban PL. Quantitative mass spectrometry:an overview. *Philos. Trans. R. Soc. A*, 2016 374: 20150382

Watson DG. Pharmaceutical Analysis. Edinburgh, Churchill Livingstone Elsevier, 2012, str.205-218; 376-380

Wilm M. Principles of electrospray ionization. *Mol Cell Proteomics*, 2011, 10(7):M111.009407.

Wu H, Tang K. Highly Sensitive and Robust Capillary Electrophoresis-Electrospray Ionization-Mass Spectrometry: Interfaces, Preconcentration Techniques and Applications. *Rev. Anal. Chem.*, 2020, 39(1): 45-55.

## 8. SAŽETAK/ SUMMARY

Rak dojke najčešća je zloćudna bolest kod žena. U današnje vrijeme mortalitet mu opada zbog novih terapijskih metoda, unatoč trajnom porastu incidencije. Kako bi se osiguralo pravilno doziranje terapije koje će osigurati najbolju učinkovitost lijeka te njegove nuspojave svesti na minimum, važno je pratiti koncentracije lijekova u plazmi. Kod ispitivanja bioloških uzoraka, važno je da metoda bude osjetljiva kako bi mogla detektirati analite niskih koncentracija te ih također učinkovito razdvojiti od interferencija koje su također prisutne. U ovome radu, analiti su bili šest lijekova za rak dojke: ribociklib, abemaciclib i palbociklib kao CDK4/6 inhibitori, anastrozol i letrozol kao nesteroidni inhibitori aromataze te fulvestrant kao kompetitivni antagonist ER. U literaturi još nije opisana uporaba MEKC-MS/MS u analizi ovih lijekova.

Cilj ovoga rada bio je odrediti optimalne MS/MS uvjete kako bismo osigurali zadovoljavajuću osjetljivost metode i kvantifikaciju ovih lijekova. Optimizirani uvjeti bili su: temperatura (75-250 °C) i protok pomoćnog plina (3-11 L/min), protok (2-12  $\mu$ L/min) i sastav pomoćne tekućine - prikladno organsko otapalo (metanol, izopropanol, etanol, acetonitril), njegov udio (50-80%, v/v) i sadržaj mravlje kiseline (0-0,5%, v/v). Također su optimizirani napon mlaznice (0-2000 V) i napon kapilare (2000-4000 V). Parametri plina u ESI izvoru koji su optimizirani uključuju temperaturu (200-350 °C), protok (5-11 L/min) i tlak plina za raspršivanje (6-14 psi). Dobiveni su sljedeći rezultati: optimalna temperatura pomoćnog plina je 250°C, a njegov protok 5 L/min. Kao najbolje organsko otapalo u sastavu pomoćne tekućine pokazao se metanol i to u udjelu od 70%. Optimalni udio mravlje kiseline u pomoćnoj tekućini je 0,2%, a protok pomoćne tekućine 1 mL/min. Optimalni napon mlaznice je 2000 V, a napon kapilare 2500 V. Parametri plina u ESI izvoru su: temperatura 350 °C, protok 9 L/min i tlak plina za raspršivanje 12 psi.

Breast cancer is the most common malignant disease in women. Nowadays, its mortality rate is decreasing due to new therapeutic methods, despite a continuous increase in incidence. To ensure proper dosing of therapy that will maximize drug efficacy and minimize side effects, it is important to monitor drug concentrations in plasma. When analyzing biological samples, it is essential for the method to be sensitive enough to detect analytes at low concentrations and effectively distinguish them from interfering substances that are also present. In this study, the analytes were six breast cancer drugs: ribociclib, abemaciclib, and palbociclib as CDK4/6 inhibitors, anastrozole and letrozole as non-steroidal aromatase inhibitors and fulvestrant as a competitive ER antagonist. The use of MEKC-MS/MS in the analysis of these drugs has not yet been described in the literature.

The aim of this study was to determine the optimal MS/MS conditions to ensure satisfactory method sensibility and quantification of these drugs. The optimized conditions were: temperature (75-250 °C) and sheath gas flow (3-11 L/min), flow rate (2-12  $\mu$ L/min) and sheath liquid composition - suitable organic solvent (methanol, isopropanol, ethanol, acetonitrile), its proportion (50-80%, v/v) and formic acid content (0-0.5%, v/v). Nozzle voltage (0-2000 V) and capillary voltage (2000-4000 V) were also optimized. The ESI source gas parameters which were optimized are temperature (200-350 °C), flow (5-11 L/min) and nebulizing gas pressure (6-14 psi). The following results were obtained: the optimal sheath gas temperature is 250°C, with a flow rate of 5 L/min. Methanol at a concentration of 70% proved to be the best organic solvent in the composition of the sheath liquid. The optimal formic acid content in the sheath liquid is 0.2%, with a sheath liquid flow rate of 1 mL/min. The optimal nozzle voltage is 2000 V, while the capillary voltage is 2500 V. The ESI source gas parameters are: temperature 350°C, flow rate 9 L/min, and nebulizing gas pressure 12 psi.

# Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Studij: Farmacija  
Zavod za analitiku i kontrolu lijekova  
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

## Optimizacija uvjeta detekcije MEKC-MS/MS metode za istovremeno određivanje šest lijekova u terapiji raka dojke

Petra Stjepanović

### SAŽETAK

Rak dojke najčešća je zloćudna bolest kod žena. U današnje vrijeme mortalitet mu opada zbog novih terapijskih metoda, unatoč trajnom porastu incidencije. Kako bi se osiguralo pravilno doziranje terapije koje će osigurati najbolju učinkovitost lijeka te njegove nuspojave svesti na minimum, važno je pratiti koncentracije lijekova u plazmi. Kod ispitivanja bioloških uzoraka, važno je da metoda bude osjetljiva kako bi mogla detektirati analite niskih koncentracija te ih također učinkovito razdvojiti od interferencija koje su također prisutne. U ovome radu, analiti su bili šest lijekova za rak dojke: ribociklib, abemaciklib i palbociklib kao CDK4/6 inhibitori, anastrozol i letrozol kao nesteroidni inhibitori aromataze te fulvestrant kao kompetitivni antagonist ER. U literaturi još nije opisana uporaba MEKC-MS/MS u analizi ovih lijekova.

Cilj ovoga rada bio je odrediti optimalne MS/MS uvjete kako bismo osigurali zadovoljavajuću osjetljivost metode i kvantifikaciju ovih lijekova. Optimizirani uvjeti bili su: temperatura (75- 250 °C) i protok pomoćnog plina (3-11 L/min), protok (2-12 µL/min) i sastav pomoćne tekućine - prikladno organsko otapalo (metanol, izopropanol, etanol, acetonitril), njegov udio (50-80%, v/v) i sadržaj mravlje kiseline (0-0,5%, v/v). Također su optimizirani napon mlaznice (0-2000 V) i napon kapilare (2000-4000 V). Parametri plina u ESI izvoru koji su optimizirani uključuju temperaturu (200-350 °C), protok (5-11 L/min) i tlak plina za raspršivanje (6-14 psi). Dobiveni su sljedeći rezultati: optimalna temperatura pomoćnog plina je 250°C, a njegov protok 5 L/min. Kao najbolje organsko otapalo u sastavu pomoćne tekućine pokazao se metanol i to u udjelu od 70%. Optimalni udio mravlje kiseline u pomoćnoj tekućini je 0,2%, a protok pomoćne tekućine 1 mL/min. Optimalni napon mlaznice je 2000 V, a napon kapilare 2500 V. Parametri plina u ESI izvoru su: temperatura 350 °C, protok 9 L/min i tlak plina za raspršivanje 12 psi.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 38 stranica, 15 grafičkih prikaza, 2 tablica i 28 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: rak dojke, spektrometrija masa, micelarna elektrokinetička spektrometrija spregnuta sa spektrometrijom masa

Mentor: **Dr. sc. Miranda Sertić**, izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Miranda Sertić**, izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

**Dr. sc. Maja Ortner Hadžiabdić**, izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

**Dr. sc. Dubravka Vitali Čepo**, redovita profesorica Sveučilišta Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: lipanj 2024.

## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Study: Pharmacy  
Department of Pharmaceutical Analysis  
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

### Optimization of MEKC-MS/MS Detection Conditions for the Simultaneous Determination of Six Drugs in Breast Cancer Therapy

Petra Stjepanović

#### SUMMARY

Breast cancer is the most common malignant disease in women. Nowadays, its mortality rate is decreasing due to new therapeutic methods, despite a continuous increase in incidence. To ensure proper dosing of therapy that will maximize drug efficacy and minimize side effects, it is important to monitor drug concentrations in plasma. When analyzing biological samples, it is essential for the method to be sensitive enough to detect analytes at low concentrations and effectively distinguish them from interfering substances that are also present. In this study, the analytes were six breast cancer drugs: ribociclib, abemaciclib, and palbociclib as CDK4/6 inhibitors, anastrozole and letrozole as non-steroidal aromatase inhibitors and fulvestrant as a competitive ER antagonist. The use of MEKC-MS/MS in the analysis of these drugs has not yet been described in the literature.

The aim of this study was to determine the optimal MS/MS conditions to ensure satisfactory method sensibility and quantification of these drugs. The optimized conditions were: temperature (75-250 °C) and sheath gas flow (3-11 L/min), flow rate (2-12 µL/min) and sheath liquid composition - suitable organic solvent (methanol, isopropanol, ethanol, acetonitrile), its proportion (50-80%, v/v) and formic acid content (0-0.5%, v/v). Nozzle voltage (0-2000 V) and capillary voltage (2000-4000 V) were also optimized. The ESI source gas parameters which were optimized are temperature (200-350 °C), flow (5-11 L/min) and nebulizing gas pressure (6-14 psi). The following results were obtained: the optimal sheath gas temperature is 250°C, with a flow rate of 5 L/min. Methanol at a concentration of 70% proved to be the best organic solvent in the composition of the sheath liquid. The optimal formic acid content in the sheath liquid is 0.2%, with a sheath liquid flow rate of 1 mL/min. The optimal nozzle voltage is 2000 V, while the capillary voltage is 2500 V. The ESI source gas parameters are: temperature 350°C, flow rate 9 L/min, and nebulizing gas pressure 12 psi.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 38 pages, 15 figures, 2 tables and 28 references. Original is in Croatian language.

Keywords: breast cancer, mass spectrometry, micellar electrokinetic chromatography coupled with mass spectrometry

Mentor: **Miranda Sertić, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Miranda Sertić, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Maja Ortner Hadžiabdić, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Dubravka Vitali Čepo, Ph.D.** Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: June 2024.